

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Institut für Neurophysiologie
des Fachbereichs Medizin der Goethe-Universität Frankfurt

Neurophysiologische Charakterisierung von adulten vulnerablen und resistenten Motoneuronen in einem Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt

von
Frau Dipl.-Hum.Biol. Andrea Fuchs
aus Aschaffenburg

Marburg/Lahn, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 03.02.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent: PD Dr. Burkhard Schütz
Korreferent: Prof. Dr. Dominik Oliver

***Die Wissenschaft kann die letzten Rätsel der Natur nicht
lösen, weil wir letztlich selbst ein Teil des Rätsels sind,
das wir zu lösen versuchen.
(Max Planck)***

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das motorische System	1
1.2 Die Amyotrophe Lateralsklerose	3
1.2.1 Häufigkeit und Ethnologie	3
1.2.2 Symptomatik und Diagnose	4
1.2.3 Ätiologie und Degenerationsmechanismen	5
1.2.3.1 Familiäre ALS	6
1.2.3.2 Sporadische ALS	7
1.2.4 Differentielle Vulnerabilität	11
1.2.5 Therapie	13
1.2.6 Tiermodelle zur Grundlagenforschung	13
1.2.6.1 Tiermodelle der ALS	13
1.2.6.2 Charakterisierung des SOD1-G93A Mausmodells	14
1.3 Physiologie und Pathophysiologie von Motoneuronen	15
1.3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von Motoneuronen	16
1.3.1.1 Kanäle und Entladungseigenschaften	16
1.3.1.2 Eingliederung in das Netzwerk	19
1.3.1.3 Elektrophysiologische Eigenschaften von Motoneuronen bei ALS	20
1.3.2 Calciumhomöostase in Motoneuronen	22
1.3.2.1 Calciumquellen in Motoneuronen	23
1.3.2.2 Calciumtransport in Mitochondrien	24
1.3.2.3 Das Endoplasmatische Retikulum als Calciumspeicher	29
1.3.2.4 Calciumextrusion über die Plasmamembran	31
1.3.2.5 Calciumhomöostase in Motoneuronen bei ALS	32
1.4 Ziel der Arbeit	34

2	Material und Methoden	35
2.1	Mausmodell	35
2.1.1	Definition des Krankheitsendstadiums	35
2.1.2	Genotypisierung	36
2.2	Präparation adulter Hirnschnitte	37
2.3	Elektrophysiologische Charakterisierung	40
2.3.1	Prinzip der <i>Patch-Clamp</i> -Ableitung	40
2.3.2	Messplatz	41
2.3.3	Generierung der Messkonfiguration	43
2.3.4	Messprotokolle	45
2.3.5	Datenanalyse und Auswertung	47
2.4	Fluorometrische Messung der Calciumkonzentration und des mitochondria-	
	len Membranpotentials	50
2.4.1	Prinzip der fluorometrischen Messungen	50
2.4.2	Messplatz	53
2.4.3	Messprotokolle	54
2.4.4	Datenanalyse und Auswertung	55
2.4.5	Bestimmung der Dissoziationskonstante	57
2.5	Immunhistochemie	58
2.6	Statistische Auswertung	60
2.7	Lösungen	60
2.8	Material	61
3	Ergebnisse	64
3.1	Elektrophysiologische Charakterisierung von adulten Motoneuronen	64
3.1.1	Charakterisierung der Motoneurone des Ncl. Hypoglossus	65
3.1.1.1	Elektrophysiologische Grundcharakterisierung	65
3.1.1.2	Persistierende Einwärtsströme	71
3.1.2	Charakterisierung der Motoneurone des Ncl. Oculomotorius	73
3.1.3	Vergleich der Eigenschaften vulnerabler Motoneurone des Ncl. Hy-	
	poglossus und resistenter Motoneurone des Ncl. Oculomotorius . . .	73
3.2	Fluorometrische Messungen der Calciumkonzentration und des mitochon-	
	drialen Membranpotentials	76
3.2.1	Fluorometrische Analyse der Motoneurone des Ncl. Hypoglossus . .	76
3.2.1.1	Analyse der Calciumsignale	77
3.2.1.2	Calciumtransport in die Mitochondrien	79
3.2.1.3	Abschätzung des mitochondrialen Membranpotentials . . .	85
3.2.1.4	Calciumspeicherung im Endoplasmatischen Retikulum . . .	88

3.2.1.5	Calciumextrusion über die Plasmamembran	89
3.2.2	Fluorometrische Analyse der Motoneurone des Ncl. Oculomotorius . .	92
3.2.2.1	Analyse der Calciumsignale	92
3.2.2.2	Calciumtransport in die Mitochondrien	94
4	Diskussion	96
4.1	Methodik und Mausmodell	96
4.2	Deutung und Einordnung der elektrophysiologischen Charakterisierung	100
4.2.1	Weitere Reifung der Motoneurone nach P10	100
4.2.2	Erregbarkeit und persistierende Einwärtsströme adulter Motoneurone im ALS-Modell	102
4.2.3	Unterschiede zwischen vulnerablen und resistenten Motoneuronen . .	104
4.2.4	Zusammenfassung der elektrophysiologischen Charakterisierung und Ausblick	107
4.3	Deutung und Einordnung der fluorometrischen Messungen	108
4.3.1	Ursachen für die verlangsamte Erholung des Calciumsignals	109
4.3.1.1	Verringerung der Transportleistung des mitochondrialen Calciumuniporters als Ursache der mitochondrialen Störung	110
4.3.1.2	Der mitochondriale Natrium-Calcium-Austauscher trans- portiert Calcium in Mitochondrien	111
4.3.1.3	Die Rolle der mitochondrialen Permeabilitätstransitions- pore bleibt unklar	113
4.3.1.4	Das Endoplasmatische Retikulum trägt nur einen kleinen Anteil zu der Calciumspeicherung bei	113
4.3.1.5	Der Calciumtransport über die Plasmamembran ist bei G93A hMN wahrscheinlich gesteigert	114
4.3.2	Unterschiede zwischen vulnerablen und resistenten Motoneuronen . .	115
4.3.3	Die Störung der Calciumhomöostase ist spezifisch für das Endstadium der ALS	118
4.4	Zusammenfassung der postulierten Degenerations- mechanismen und Therapieansätze	121
	Literaturverzeichnis	124
	Abbildungsverzeichnis	154
	Tabellenverzeichnis	156

Zusammenfassung

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die Motoneurone (MN) von Kortex, Hirnstamm und Spinalmark betrifft. Folgen sind Lähmung der Muskulatur und der Tod des Patienten meist innerhalb von drei bis fünf Jahren nach Auftritt der ersten Symptome. Eine wirksame Therapie fehlt. Als gemeinsame finale Ursache der MN-Degeneration bei dieser multifaktoriellen Krankheit werden Übererregbarkeit der Neurone, Calciumüberladung und mitochondriale Schädigung diskutiert. Erregbarkeits-eigenschaften und Calciumhomöostase der MN konnten in Mausmodellen der ALS auf Einzelzellebene aus technischen Gründen bisher nur in früh postnatalen (<Postnataltag 10), symptomfreien Tieren untersucht werden. Eine Analyse zu einem Zeitpunkt der Neurodegeneration ist jedoch für eine Ursachenforschung und Therapieentwicklung essentiell.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals im SOD1-G93A ALS-Mausmodell eine umfassende Charakterisierung von adulten MN mittels *Whole-Cell Patch-Clamp*-Messung und fluorometrischer Analysen des Calciumsignals im akuten Hirnschnitt durchgeführt. Verglichen wurden die Eigenschaften von bei ALS hochvulnerablen MN des Ncl. Hypoglossus (hMN) in Wildtypmäusen und in SOD1-G93A Mäusen im Endstadium der Krankheit. Die höhere Erregbarkeit der SOD1-G93A MN im Vergleich zum Wildtyp in Verbindung mit einem größeren persistierenden Natriumeinwärtsstrom, die in früh postnatalen Tieren beschrieben wurden, konnten in adulten Mäusen nicht beobachtet werden. Bei einer weitestgehend unauffälligen Elektrophysiologie wurde jedoch eine signifikant langsamere Erholung des Calciumsignals im Endstadium der Krankheit aufgedeckt, wenn die Neurone durch elektrische Stimulation mit hohen Calciumkonzentrationen belastet wurden. Bei einer Stimulationsstärke im unteren physiologischen Bereich waren keine Unterschiede zum Wildtyp sichtbar. Ein Vergleich mit den bei ALS resistenten MN des Ncl. Oculomotorius zeigte, dass diese Calciumhomöostasestörung spezifisch für die vulnerablen hMN ist und somit eine Erklärung für die differentielle Vulnerabilität der Neurone liefert.

Ursächlich für die Störung war eine Verringerung der mitochondrialen Calciumaufnahme durch Calciumuniporter bei primär konstanter Triebkraft. Dies konnte mittels mitochondrialer Entkopplung, spezifischer pharmakologischer Blockade von Calciumtransportern und fluorometrischer Messung von Calcium- und Rhodamine123-Signalen gezeigt werden. Bei Blockade der Calciumaufnahme in Mitochondrien und in das Endoplasmatische Retikulum konnte außerdem indirekt eine Steigerung der Transportkapazität von Calciumtransportern der Plasmamembran in hMN von SOD1-G93A Mäusen im Endstadium der Krankheit beobachtet werden.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass vulnerable MN in dem ALS-Mausmodell eine mitochondriale Störung der Calciumaufnahme durch eine Steigerung des Plasmamembran-Calciumtransportes auszugleichen versuchen. Bei hoher Calciumbelastung jedoch versagt im Endstadium der Krankheit diese Kompensation und eine Calciumüberladung als finale Degenerationsursache von MN bei ALS ist wahrscheinlich.

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects motoneurons (MN) of the motor cortex, the brainstem and the spinal cord and leads to paralysis and atrophy of the innervated muscles. Patients mostly die within three to five years after symptom onset. There is no curative therapy. Overexcitability, calcium overload and mitochondrial disturbances are discussed as a common final cause of MN degeneration in this multifactorial disease. Because of technical difficulties, so far excitability and calcium dynamics could only be analyzed in mouse models of ALS on a single cell level up to a postnatal age of ten days (P10), when mice did not show any symptoms. However, to study the direct mechanisms of neurodegeneration and to develop new therapies, analyses of MN during the stage of degeneration are essential.

Here, for the first time a characterization of adult MN in acute brainstem slices of the SOD1-G93A ALS mouse model was performed using whole-cell patch-clamp measurements and fluorometric fura-2 calcium-imaging. The properties of the highly vulnerable hypoglossal MN were compared in wildtype and SOD1-G93A mice during disease endstage. The higher excitability and the increased persistent sodium inward currents, published for P10 SOD1-G93A mice, were not present in adult animals. Although electrophysiological properties were not prominently changed, the calcium clearance was significantly impaired in comparison to wildtype during disease endstage when MN were electrically stimulated to load them with high concentrations of calcium. However, with low physiological calcium load there were no differences. By comparing the vulnerable hMN with the resistant oculomotor MN, it was observed that the clearance deficit was specific for hMN and thereby is an explanation for the differential vulnerability.

By fura-2 calcium-imaging in combination with mitochondrial uncoupling, specific pharmacological blocking of different calcium transporters and rhodamine123 imaging, a reduced calcium transport through the mitochondrial calcium uniporter was revealed as a cause for the impairment whereas the driving force for calcium into mitochondria was not changed. By blocking both the mitochondrial and the ER calcium uptake an increase of calcium transport by plasma membrane calcium transporters was indirectly shown in hMN of SOD1-G93A mice.

From these result one can conclude that in the used ALS mouse model vulnerable MN try to compensate for a mitochondrial calcium uptake failure by upregulating plasma membrane calcium transport. However, with high calcium load during disease endstage this compensatory mechanism fails and a calcium overload might be the final cause of MN degeneration in ALS.

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeingebräuchliche Abkürzungen der deutschen Sprache sowie Abkürzungen und Maßeinheiten, die auf Empfehlung der IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) beruhen oder zu den SI-Einheiten (*Système Internationale d'Unités*) gehören, werden nicht gesondert aufgeführt.

$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
ACSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
AHP	engl. <i>after hyperpolarization</i> , Nachhyperpolarisation
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure
ANOVA	Varianzanalyse
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosin-Triphosphat
BAPTA	bis(Aminophenoxy)-Ethan-Tetraessigsäure
BK	calciumabhängiger Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit
C_{fast}	schnelle Kapazitätskomponente
C_m	Membrankapazität
C_{slow}	langsame Kapazitätskomponente
Ca_v	spannungsabhängiger Calciumkanal
cAHP	engl. <i>compound after hyperpolarization</i> , gemeinsame Nachhyperpolarisation
CCD	engl. <i>charged coupled device</i> , ladungsgekoppeltes Bauteil
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
CsA	Cyclosporin A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EAAT2	Exzitatorische Aminosäuren-Transporter 2
EGTA	(Ethylenglycol-bis(Aminoethylether)-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETC	Elektronentransportkette

F	Fluoreszenzintensität
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
fAHP	engl. <i>fast after hyperpolarization</i> , schnelle Nachhyperpolarisation
fALS	familiäre Form der Amyotrophen Lateralsklerose
FCCP	Carbonylcyanid-P-Trifluoromethoxyphenylhydrazon
FTD	Frontotemporale Demenz
FUS/TLS	engl. <i>fused in sarcoma/ translocated in liposarcoma</i>
G93A	Mausstamm B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur, Mutation im SOD1-Gen an Position 93
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GluR	Glutamatrezeptor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosin-Triphosphat
HCN	hyperpolarisationsaktivierter Kationenkanal
hMN	Motoneurone des Ncl. Hypoglossus
IC ₅₀	Konzentration eines Liganden zur halbmaximalen Hemmung des Rezeptors
IF	intrafusale Muskelfasern
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IP ₃ R	Inositoltrisphosphat-Rezeptor
K _d	Dissoziationskonstante
KGlu	Kaliumgluconat
L-Typ	persistierender Calciumkanal mit großen Strömen und niedriger Aktivierungsschwelle
Letm1	engl. <i>leucin-zipper EF-hand containing transmembrane protein 1</i>
M.	lat. <i>musculus</i> , Muskel
mAHP	engl. <i>medium after hyperpolarization</i> , Nachhyperpolarisation mittlerer Dauer
mCU	mitochondrialer Calciumuniporter
MiCU1	mitochondrialer Calciumuniporter 1 (Gen)
MN	Motoneuron
mNCX	mitochondrialer Natrium-Calcium-Austauscher
MND	engl. <i>motor neuron disease</i> , Motoneuronkrankheit
mPTP	mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
N.	lat. <i>nervus</i> , Nerv
Na _v	spannungsabhängiger Natriumkanal
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid

Ncl.	lat. <i>nucleus</i> , Kern
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher der Plasmamembran
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
oMN	Motoneurone des Ncl. Oculomotorius
OPA	Operationsverstärker
P	Postnataltag
P2X	ionotroper ATP-Rezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIC	persistierender Einwärtsstrom
PMCA	Calcium-ATPase der Plasmamembran
PPADS	Pyridoxalphosphat-Azophenyl-Disulfonat
R _S	Serienwiderstand
RaM	engl. <i>rapid uptake mode</i> , schneller Aufnahmemodus für Calcium in die Mitochondrien
Rh123	Rhodamine123
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
Ru360	Ruthenium 360
RyR	Ryanodin-Rezeptor
sALS	sporadische Form der Amyotrophen Lateralsklerose
SERCA	Sarko-Endoplasmatisches Retikulum-Calcium-ATPase
SK	calciumabhängiger Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit
SOD1	Kupfer/Zink-Superoxiddismutase 1
TARDBP	engl. <i>transactivation response DNA binding protein</i> (Gen)
TDP-43	engl. <i>transactivation response DNA binding protein</i> (Protein)
TEA	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TTX	Tetrodotoxin
Typ FF	Motoneurontyp mit schnellen, ermüdbaren Entladungseigenschaften
Typ FR	Motoneurontyp mit schnellen, nicht ermüdenden Entladungseigenschaften
Typ S	Motoneurontyp mit langsamen, nicht ermüdenden Entladungseigenschaften
U _m	Membranpotential
UCP	engl. <i>uncoupling protein</i>
V ₅₀	Spannung für halbmaximale Aktivierung eines Ionenkanals
VDAC	spannungsabhängiger Anionenkanal
wt	Wildtyp

1

Einleitung

1.1 Das motorische System

Laufen und Kommunizieren sind nur zwei Beispiele einer Vielzahl von Handlungsweisen, die es Tieren und Menschen erlauben sich an ihre Umwelt anzupassen, sich zu ernähren, zu atmen, sich fortzupflanzen und vor Gefahren zu schützen. Essentiell für diese lebensnotwendigen Änderungen eines momentanen Zustandes sind Bewegungen, ausgelöst durch Kontraktionen verschiedener Muskelgruppen, agonistische und antagonistische Muskeln der Gliedmaßen oder Gesichts- und Kehlkopfmuskulatur in den aufgeführten Beispielen. Initiiert und reguliert werden die Muskelkontraktionen durch Signale aus spezialisierten Nervenzellen, den Motoneuronen (MN). Diese stellen eine Schnittstelle zwischen höheren neuronalen Zentren im Gehirn (z.B. Basalganglien, Zerebellum, Motorkortex) und der Peripherie dar und sind somit der einzige Weg des Nervensystems zur Umsetzung bewusster und unbewusster Handlungsweisen. Erkranken oder degenerieren diese Neurone kommt es zu starken Einschränkungen der Lebensqualität bis hin zum Tod.

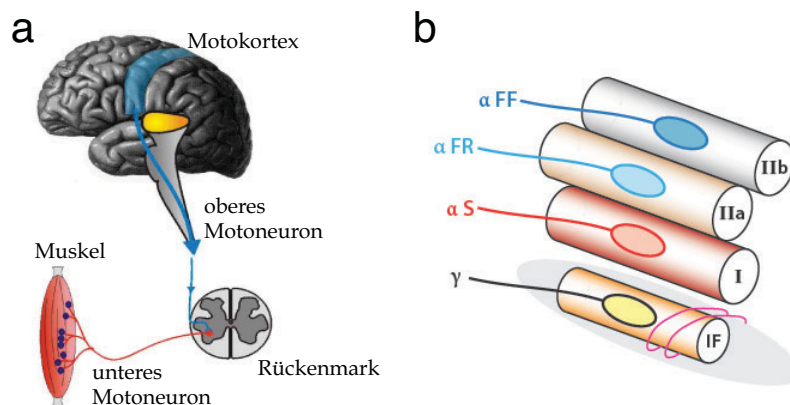


Abbildung 1.1: Gliederung des Motorsystems

(a) Vom Motorkortex aus innervieren die oberen Motoneurone im Hirnstamm und Rückenmark die unteren Motoneurone, die mit Muskelfasern motorische Einheiten bilden. (verändert aus [Sinnesphysiologie, 2011])
(b) Unteren Motoneurone lassen sich in α -, β - und γ -Motoneurone unterteilen, α -Motoneurone weiter je nach Eigenschaft in die Typen S, FR und FF, die Muskelfasern der Typen I, IIa und IIb innervieren. γ -Motoneurone innervieren intrafusale Muskelfasern (IF) der Muskelspindeln. (verändert aus [Kanning et al., 2010])

Motoneurone werden nach Lage und Aufgabe in verschiedene Gruppen unterteilt. Als primäres oder oberes Motoneuron bezeichnet man glutamaterge Zellen im Motorkortex, die Signale aus koordinierenden Zentren empfangen, integrieren und an die sekundären oder unteren MN weitergeben. Die unteren MN liegen im Hirnstamm oder im Vorderhorn des Rückenmarks (siehe Abb. 1.1a). Untere α -Motoneurone innervieren dann die Muskelfasern und bilden mit diesen eine Motorische Einheit. Ihr Neurotransmitter ist Acetylcholin. Außerdem gibt es noch wenig erforschte β -Motoneurone und γ -Motoneurone, die die intrafusale Muskulatur der Muskelspindeln zur muskelinternen Rückkopplung innervieren. Motorische Einheiten lassen sich aufgrund ihrer Entladungsgeschwindigkeit, Ermüdbarkeit und Kraftentwicklung weiter unterteilen in Typ S (engl. *slow*, langsame Frequenz, ausdauernd, wenig Kraftentwicklung) für Haltearbeit, Typ FR (engl. *fast, fatigue resistant*, schnell, ermüdungsresistent, mittleres Kraftniveau) und Typ FF (engl. *fast, fatiguable*, schnell, leicht ermüdend, große Kraftentwicklung) für schnelle, impulsive Bewegungen. Diese Typen unterscheiden sich auch in der Größe des Motoneuronsomas, wobei Typ S Motoneurone am kleinsten und Typ FF am größten sind. Typ S α -Motoneurone innervieren Typ I Muskelfasern, Typ FR α -MN Typ IIa Muskelfasern und Typ FF α -MN Typ IIb Muskelfasern (siehe Abb. 1.1b). [Kanning et al., 2010]

Motoneurone des Nucleus Hypoglossus und des Nucleus Oculomotorius

Alle Messungen der vorliegenden Arbeit wurden in zwei Populationen von MN durchgeführt, die in verschiedenen Kernen (lat. *nucleus*, Ncl.) in Hirnstamm und Mittelhirn liegen, im Ncl. Hypoglossus und im Ncl. Oculomotorius. Die Axone der Motoneurone des Ncl. Hypoglossus bilden den zwölften Hirnnerv, den Nervus (N.) Hypoglossus, der die Zungenmuskeln innerviert. Die Neurone erfüllen daher eine essentielle Aufgabe bei der Generierung von Sprache, beim Schlucken, Kauen und Freihalten der Atemwege. Der Kern liegt medial im caudalen Hirnstamm, ventral des Zentralkanals. Man unterscheidet im Kern Neuronengruppen für die Innervation intrinsischer Zungenmuskeln und die Unterkerne Ncl. Genioglossus, Ncl. Hyoglossus und Ncl. Styloglossus, die die entsprechenden extrinsischen Zungenmuskeln versorgen [Krammer et al., 1979a; Lin and Barkhaus, 2009]. Typ S Motoneurone kommen in dem hier untersuchten Unterkern, dem Ncl. Genioglossus, in der Regel nicht vor [Volz et al., 2007]. Neben Eingängen aus dem Motorkortex und dem Ncl. Trigemini, werden die hypoglossalen Motoneurone z.B. auch von Neuronen des benachbarten Prä-Bötzinger-Komplexes afferent innerviert. Letztere führen zu einer rhythmischen Aktivierung der Motoneurone während des Atemzyklus [Tarras-Wahlberg and Reklings, 2009]. Die Motoneuronaxone des Ncl. Oculomotorius bilden einen Teil des dritten Hirnnervs (N. Oculomotorius). Sie innervieren vier der sechs äußeren Augenmuskeln, die zwei inneren Augenmuskeln und den Lidheber. Der Ncl. Oculomotorius liegt medial im Mittelhirn,

ventral des Aquädukts. Die Neurone können Augenbewegungen in alle Richtungen veranlassen, außer nach lateral und lateral unten. Die übrigen äußeren Augenmuskeln werden vom N. Abducens und vom N. Trochlearis versorgt. Mit deren Kernen haben die oculomotorischen Neurone zur Koordination afferente und efferente Verknüpfungen. Eingänge aus vestibulären Reflexbögen dienen der Blickstabilisierung bei Kopfbewegung, retikuläre Eingänge steuern willkürliche Augenbewegungen [Büttner-Ennever and Horn, 1997].

1.2 Die Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine neurodegenerative Erkrankung von primären Motoneuronen des Motorkortex und sekundären Motoneuronen des Hirnstamms sowie des Rückenmarks. Aufgrund des Absterbens der MN kommt es im Verlauf der Krankheit zum Verlust der Willkürmotorik und schließlich zum Tod. Die ALS wurde erstmals 1869 von dem französischen Neurologen Jean-Martin Charcot beschrieben, der einen Innervationsverlust der Muskeln (*a-myotroph*: die Muskeln nicht ernährend) und eine Vernarbung des Seitenstranges im Rückenmark, in dem die motorischen Bahnen verlaufen (Lateralsklerose), beobachtete [Charcot and Joffroy, 1869]. Im englischsprachigen Raum wird die ALS häufig noch als Motoneuronkrankheit (engl. *motor neuron disease*, MND) oder nach einem erkrankten berühmten amerikanischen Baseballspieler Lou-Gehrig-Krankheit bezeichnet.

1.2.1 Häufigkeit und Ethnologie

Neben der häufigeren Alzheimerkrankheit und dem Morbus Parkinson wird die ALS als eine seltene neurodegenerative Krankheit angesehen. In Europa liegt die Inzidenz pro Jahr bei 2.16 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohnern. Im Mittel tritt die Krankheit um das 65. Lebensjahr auf, nur bei etwa 5% vor dem 30. Lebensjahr. Männer sind mit 1.15:1 etwas häufiger betroffen als Frauen. Im Gegensatz zu den häufigeren Neurodegenerationskrankheiten ist die ALS jedoch sehr rasch fortschreitend und führt mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung von drei bis fünf Jahren meist rasch zum Tod [Logroscino et al., 2010]. Generell liegt die Inzidenz weltweit auf einem ähnlichen Niveau, Volksstämme spanischen Ursprungs erkranken etwas seltener. Bei Volksstämmen im Westpazifik tritt die ALS 50-100 mal häufiger auf. Genetische Prädisposition und Umwelttoxine werden als Ursachen diskutiert. Am bekanntesten ist der Fall der Chamorro auf Guam, bei denen durch die Aufnahme eines Toxins von Palmfarnen mit der Nahrung die Inzidenz bei 100 pro 100.000 lag. Eine Häufung zeigt sich auch bei Fußballern. Hier könnten die Ursachen Nahrungsergänzungsmittel oder Traumata sein [Vanacore et al., 2006]. (Für Übersichtsartikel siehe [Cronin et al., 2007; Harwood et al., 2009; Kiernan et al., 2011; Silani et al., 2011]).

1.2.2 Symptomatik und Diagnose

In Folge der Degeneration von oberen und unteren Motoneuronen kommt es in der frühen Phase der Krankheit zur Ausbildung unterschiedlicher Symptome. Spastik und Hyperreflexie sind Zeichen der Degeneration von Neuronen im Motorkortex. Muskelschwäche und Atrophie begründen sich auf den Verlust von sekundären Motoneuronen. Faszikulationen (Zuckungen von einzelnen Muskelfaserbündeln) entstehen bei Denervierung und Reinnervation von Muskelfasern. Im weiteren Verlauf schreitet die Muskelschwäche fort und es kommt zu Lähmungen verschiedener Muskelgruppen. Im Endstadium schränken Sprech- und Schluckstörungen, Schmerzen durch Immobilität und eine Schwächung der Atemmuskulatur die Lebensqualität ein. Es kommt zur Mangelernährung und Hypoventilation und meist aufgrund von Aspiration zu Lungenentzündung, welche die Haupttodesursache darstellt. Neben den Symptomen der Motoneurondegeneration kann man bei etwa 50% aller ALS-Patienten kognitive Einschränkungen beobachten, vor allem eine Frontotemporale Demenz (FTD) mit Sprach- und Persönlichkeitsstörungen, Impulsivität, Aufmerksamkeitschwäche und Schwierigkeiten bei täglichen Routinen. Die Diagnose selbst und die Auswirkungen der fortschreitenden Lähmung führen zudem oft zu Depressionen, Apathie und Schlafstörungen. [Kiernan et al., 2011; Silani et al., 2011]

Je nach Ort des Auftretens erster Symptome unterscheidet man vor allem zwei Ausprägungen der ALS, mit etwa 70% die häufigere spinale Form, bei der zuerst eine Schwächung von Bein- oder Armmuskeln auffällt, und mit etwa 30% eine bulbäre Form, deren Erstmanifestation im Bereich der Zunge, der Kiefer- und der Schlundmuskeln liegt [Logroscino et al., 2010]. Bei beiden Formen kommt es zuerst zum Ausfall weniger Muskelgruppen, der sich dann auf benachbarte Areale ausdehnt. Die bulbäre ALS ist aggressiver, schneller fortschreitend und die Patienten haben eine kürzere Lebenserwartung von nur zwei bis drei Jahren. Hauptsymptome sind eine verwaschene Sprache und Probleme beim Kauen und Schlucken sowie Fibrillationen der Zunge [Kiernan et al., 2011; Silani et al., 2011]. Das Auftreten weiterer ALS-Unterformen, z.B. einer primären Lateralsklerose (ausschließlich Symptome eines Verlusts von oberen MN), unterschiedlichste Orte der ersten Symptome oder nicht vorhersehbare Überlebenszeit machen das Krankheitsbild variabel und schwer diagnostizier- und behandelbar [van den Berg, 2011].

1994 wurden diagnostische Kriterien festgelegt und 2000 nochmals überarbeitet, die eine Diagnosestellung weltweit vereinheitlichen sollten (El-Escorial und Awaji-Kriterien). Danach müssen neurologische Befunde wie Atrophie oder makroskopisch sichtbare Faszikulationen, sowie der Symptombeginn an einer Muskelgruppe mit Fortschritt in benachbarte Gebiete immer durch elektrophysiologische Befunde gesichert werden. Hierzu wird die Erregbarkeit der Axone getestet, die Zahl der Motorischen Einheiten abgeschätzt und Elektromyographien aufgenommen, in denen bei der ALS Fibrillationspotentiale auf akute Denervierung und komplexe, multiphasische Muskelaktionspotentiale mit großer Amplitu-

de auf eine chronische Denervierung hinweisen. Die Nervenleitgeschwindigkeit oder sensorische Nervenfasern sind in der Regel elektrophysiologisch unauffällig [Inghilleri and Iacovelli, 2011]. Transkranielle Magnetstimulation zum Test von kortikaler Übererregbarkeit, die früh im Verlauf auftritt [Vucic and Kiernan, 2006b], Bildgebung mit Magnetresonanztomographen, Laboruntersuchung von Muskelbiopsien oder der Zerebrospinalflüssigkeit und Genanalysen können die Diagnose stützen. Trotzdem dauert eine Diagnosestellung lange und es kommt immer noch zu etwa 44% falsch negativen und 8% falsch positiven Diagnosen aufgrund der Variabilität des Krankheitsbildes. Außerdem fehlt ein verlässlicher Biomarker [Kiernan et al., 2011]. Durch die Änderung der Diagnosekriterien und gesteigerter Grundlagenforschung soll dieser für die Patienten sehr belastende Zustand weiter verbessert werden.

1.2.3 Ätiologie und Degenerationsmechanismen

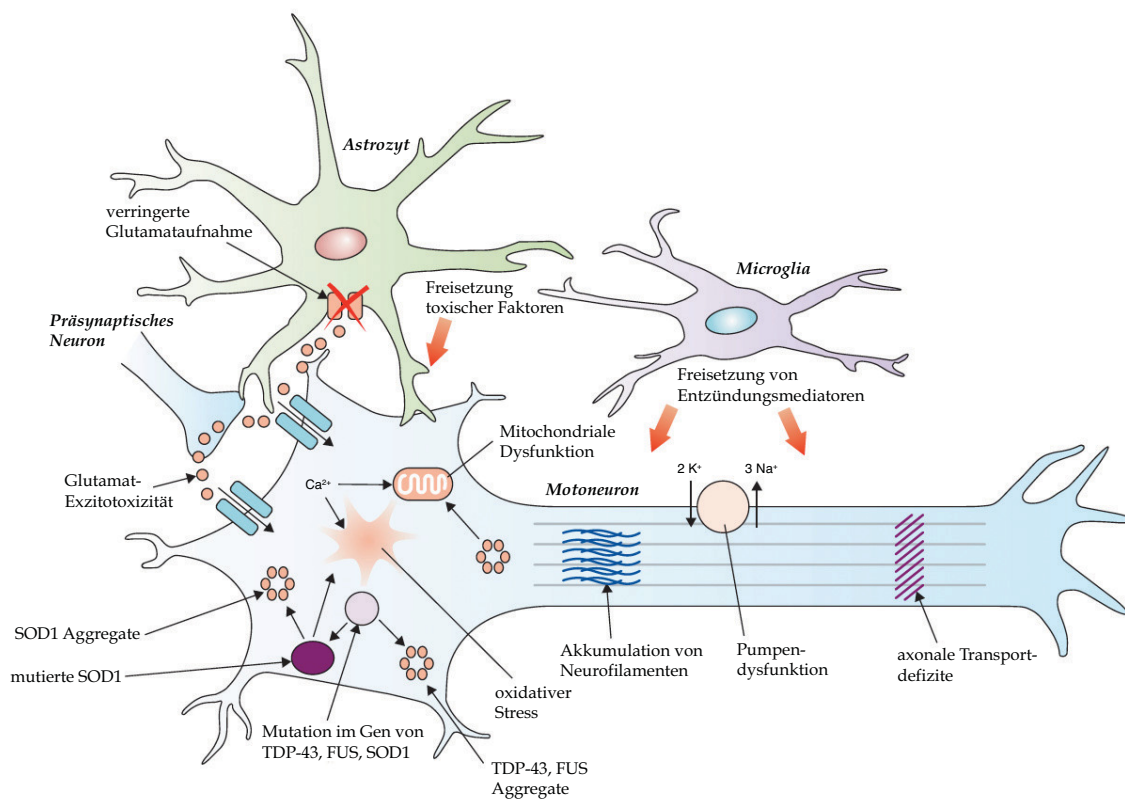


Abbildung 1.2: Degenerationsmechanismen

Schematischer Überblick der diskutierten Degenerationsurachen bei ALS, Details siehe Text. (verändert aus [Kiernan et al., 2011])

Die Ursachen der Krankheit und die Degenerationsmechanismen sind vielseitig und weitestgehend unbekannt. Eine Mischung aus genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren, wie sie bei allen neurodegenerativen Krankheiten diskutiert werden, gilt als sicher. Man unterscheidet zwischen sporadischen Formen der ALS mit unklarer Ätiologie (sALS) und den familiären Formen (fALS), bei denen eine Mutation in einem von über 12 identifizierten Genen der Krankheit zu Grunde liegt. Etwa 5-10% aller Fälle werden als familiär klassifiziert [Byrne et al., 2010].

Außerdem wird diskutiert, wo der Ursprung der Degeneration liegt. Es gibt Hinweise für ein Aufsteigen der Krankheit ausgehend von Muskeln oder den neuromuskulären Synapsen (*dying-back*-Hypothese), da eine Denervierung vor dem Absterben des Zellkörpers auftritt [Fischer and Glass, 2007] und Theorien, dass eine kortikale Übererregbarkeit zu einem absteigenden Absterben führt (*dying-forward*-Hypothese) [Vucic and Kiernan, 2006b]. Einige momentan diskutierte, mögliche Ursachen der Motoneurondegeneration sind in Abb. 1.2 zusammengefasst und sollen im Folgenden erläutert werden.

1.2.3.1 Familiäre ALS

Bei den fALS-Patienten werden Genmutationen als Ursache der Krankheit angesehen und eine Diagnose kann relativ sicher gestellt werden. Die genauen Degenerationsmechanismen sind hierbei aber unklar. Aggregationen falsch gefalteter Proteine, Wechselwirkungen mit anderen Proteinen und Organellen oder erhöhter oxidativer Stress werden untersucht.

Mit 20% der fALS-Fälle am häufigsten auftretend sind Mutationen im Gen für die Kupfer-Zink-Superoxiddismutase 1 (SOD1, Genlokus 21q22), die 1993 erstmals beschrieben wurden [Rosen et al., 1993]. Dieses zytoplasmatische Enzym wandelt Superoxid aus der Zellatmung in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid um und trägt somit zu einem Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei. Eine toxische Funktionssteigerung durch eine von mittlerweile 156 identifizierten Mutationen [ALS-Datenbank, 2011] und folgende Proteinnitrierung, freies Zink und Kupfer, Proteinaggregationen und Wechselwirkungen mit Mitochondrien werden als Pathomechanismen angesehen. Transgene Mäuse mit mutierter SOD1 sind die häufigsten Modelle für Grundlagenforschung bei ALS. Die Mutation G93A diente als Grundlage des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mausmodells. [Boillée et al., 2006; Pasinelli and Brown, 2006]

Das Gen TARDBP (*trans-activation response DNA binding protein*, Genlokus 1p36) kodiert für das 43 kDa große Protein TDP-43 (*TAR DNA binding protein*), das im Jahr 2006 in ubiquitinierten zytosolischen Einschlüssen bei ALS-Patienten mit FTD gefunden wurde [Neumann et al., 2006]. Seitdem konnten TDP-43 Aggregate in 90% aller sALS und fALS-Fälle, nicht aber in SOD1-begründeter fALS nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass Mutationen im Gen in etwa 5% der fALS-Fälle krankheitsursächlich sind. In Verbindung mit TDP-43 wird außerdem eine Mutation von FUS/TLS (*fused in sarcoma/*

translocated in liposarcoma) beschrieben, die 4% der fALS-Fälle zugrunde liegt. Beide Proteine spielen eine Rolle bei der Prozessierung von *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA), der Translation und Transkription. Eine Mutation verhindert den Transport des Proteins in den Zellkern und somit die Funktionalität. Auch bei sALS-Patienten wird ein Transportdefizit von TDP-43 und FUS/TLS vermutet, der zusammen mit oxidativem Stress zu den Aggregaten führen könnte. Mitochondriale Funktionsstörungen und eine Expressionsveränderung einiger mit ALS assoziierter Gene (u.a. EAAT2, siehe 1.2.3.2) werden als Mechanismen der Degeneration bedingt durch mutiertes oder aggregiertes TDP-43 und FUS/TLS diskutiert. [Cohen et al., 2011; Da Cruz and Cleveland, 2011; Dormann and Haass, 2011]

Weniger häufig als Mutationen bei der SOD1 oder bei TDP-43 und FUS/TLS sind Mutationen in den Genen Angiogenin, Optineurin, VABP (vesikelassoziiertes Membranprotein), Dynactin, Alsin, Senataxin oder Spatacsin, die meist atypische ALS-Formen hervorrufen. Weitere Genmutationen werden in Einzelfällen beschrieben und die Entdeckung neuer, mit ALS assoziierter Gene wird die Ursachenforschung weiter vorantreiben. [Ticozzi et al., 2011]

1.2.3.2 Sporadische ALS

Bei sporadischen Formen der ALS werden verschiedene Degenerationsursachen diskutiert, die sich oft gegenseitig bedingen.

Proteinaggregationen

Aggregationen von TDP-43 [Neumann et al., 2006] und falsch gefalteter SOD1 [Bosco et al., 2010] lassen sich auch in den meisten sporadischen ALS-Fällen nachweisen. Proteinaggregationen werden generell bei allen neurodegenerativen Krankheiten als Ursache diskutiert, Huntingtin in Morbus Huntington, β -Amyloid und Tau bei Morbus Alzheimer und α -Synuclein bei Morbus Parkinson. Dabei interagieren diese fehlgefalteten Proteine mit der axonalen Transportmaschinerie und den Mitochondrien, stören synaptische Prozesse und behindern den Proteinabbau über das Ubiquitin-Proteasom-System. Eine fehlende Korrelation von Proteinablagerungen und Zelltod bei Parkinson und der Alzheimerkrankheit weist darauf hin, dass eine Aggregation von fehlgefalteten Proteinen auch protektiv sein könnte. [Ross and Poirier, 2005]

All diese Faktoren werden auch bei der sALS diskutiert. Der neueste Befund betrifft Aggregationen von Ubiquilin 2, das beim Abbau ubiquitinierten Proteine beteiligt ist und in Ablagerungen aller untersuchten Gewebeproben von ALS-Patienten gefunden wurde [Deng et al., 2011]. Ubiquitinhaltige Proteinaggregationen (sog. *skein-like inclusions*, strangartige Einschlüsse, siehe Abb. 1.3a) aus einer Vielzahl verschiedener Proteine konnten mit der Schwere des Krankheitsverlaufs der ALS assoziiert werden [van Welsem et al., 2002]. Ob

sie Ursache oder Folge anderer degenerativer Prozesse sind, ist nicht klar. Neben Mutationen kann oxidativer Stress als ein Grund von Proteinablagerungen angeführt werden.

Oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen endogen bei der Zellatmung oder in Signalkaskaden und werden normalerweise von Enzymen wie der SOD1 abgebaut. Nehmen sie überhand oder funktioniert der Abbau nicht richtig, können sie Proteine, Lipide und Desoxyribonukleinsäure (DNA) oxidieren und schädigen. Oxidative Veränderungen wurden in ALS-Patienten und in Mausmodellen mehrfach nachgewiesen (z.B. [Ferrante et al., 1997; Andrus et al., 1998]) und als Degenerationsursache diskutiert. Wie bei den Proteinaggregationen ist oxidativer Stress aber wahrscheinlich nur Folge anderer Schädigungen wie der *gain-of-function*-Mutation der SOD1.[Barber and Shaw, 2009]

Mitochondriale Dysfunktion

Sowohl Ursache als auch Folge von oxidativem Stress kann eine mitochondriale Dysfunktion sein. Die physiologische Funktion der Mitochondrien wird unter 1.3.2.2 genauer erläutert. Eine pathophysiologische Funktionsänderung dieses essentiellen Organells führt zu Energie-depletion, gesteigerter Bildung und Freisetzung von ROS und letztendlich zur Apoptoseinduktion. Bei ALS-Patienten wurden in histologischen Studien als Zeichen der Schädigung geschwollene Mitochondrien und Störungen von Fission und Fusion [Siklós et al., 1996] gefunden. Einschlüsse mitochondrialer Membranstücke konnten als Bunina-Körperchen nachgewiesen werden [Hart et al., 1977]. In Mausmodellen wurde diese Histopathologie bestätigt [Wong et al., 1995; Martin et al., 2009], sowie biochemische Änderungen, wie eine verringerte Aktivität von Enzymen der Atmungskette [Jung et al., 2002; Mattiazzi et al., 2002] oder gestörte Calciumhomöostase nachgewiesen (siehe dazu auch 1.3.2.5). Auch der Transport von Mitochondrien entlang des Axons ist gestört [De Vos et al., 2007]. Die Schwellung der Mitochondrien (siehe Abb. 1.3b) ist ein Hinweis, dass die mitochondriale Permeabilitäts-transitions-pore (mPTP) geöffnet wurde, ein Notmechanismus der Zelle als Reaktion auf mitochondriale Überlastung [Martin et al., 2009]. Dadurch werden proapoptotische Stoffe wie Cytochrom c freigesetzt, die dann zusammen mit oxidativen Kaskadeaktivierungen zur Degeneration führen können. [Cuzzolino and Carri, 2011]

Exzitotoxizität

Ein Hauptaugenmerk bei der Erforschung der Degenerationsursachen wird auf die Hypothese der Exzitotoxizität, einer schädigenden Übererregung der MN, gelegt. Alle oben angeführten beobachteten Änderungen könnten diese hervorrufen. Hinweise für Exzitotoxizität gibt es viele. So wurde eine erhöhte Konzentration des erregenden Neurotransmitters Glutamat in der Zerebrospinalflüssigkeit von ALS-Patienten nachgewiesen [Rothstein et al., 1990], die entweder durch eine verstärkte Ausschüttung des Transmitters aus präsynap-

tischen Neuronen oder aktivierter Mikroglia herrührt oder durch verringerte Resorption von Glutamat aus dem synaptischen Spalt bedingt ist. Die erste Erklärung konnte mit Befunden im Mausmodell gestützt werden [Milanese et al., 2010]. Sie ist vereinbar mit der gezeigten Übererregbarkeit des Motorkortex und stützt die *dying-forward*-Hypothese [Vucic and Kiernan, 2006b]. Eine verringerte Resorption wurde nachgewiesen durch eine Expressionsverringering des Glutamatttransporters auf den Astrozyten (*excitatory amino acid transporter 2*, EAAT2) [Rothstein et al., 1995]. Eine erhöhte Glutamatkonzentration führt zur Übererregung glutamaterger Rezeptoren auf den Motoneuronen, die Natrium- und Calciumkonzentration in den Zellen steigt und bewirkt neben einer Zellschwellung und Energiedepletion auch die calciumabhängige Aktivierung von Signalkaskaden und degenerierenden Enzymen. Auch eine mitochondriale Schädigung und die Bildung von ROS durch eine erhöhte Calciumkonzentration wird diskutiert (siehe 1.2.3.2).

Einen additiven Faktor für vermehrten Calciumeinstrom in die MN stellt die generell hohe Expression von calciumpermeablen, glutamatergen AMPA-Rezeptoren in Motoneuronen dar. Eine weitere Expressionssteigerung beziehungsweise eine verringerte RNA-Editierung der GluR2-Untereinheit, die den AMPA-Rezeptor sonst calciumimpermeabel macht, werden diskutiert [Kawahara et al., 2004]. Auch eine intrinsische Übererregbarkeit der Motoneurone könnte zu einer Exzitotoxizität beitragen [Kiernan, 2009] (siehe 1.3.1.3). Hinzu kommt, dass MN im Vergleich zu anderen Neuronen besonders anfällig für eine Calciumbelastung sind, da sie nur geringe Mengen Calciumpufferproteine exprimieren (siehe 1.2.4). [Van Den Bosch et al., 2006]

Auch eine Funktions- und Expressionsverminderung der Na^+/K^+ -ATPase, bedingt vermutlich durch oxidativen Stress, kann über eine Störung des Membranpotentials zur Exzitotoxizität beitragen [Ellis et al., 2003].

Neben einer verstärkten glutamatergen Erregung gibt es auch Hinweise auf eine verringerte Hemmung. Durch unsere Arbeitsgruppe konnte eine verringerte Expression des Kalium-Chlorid-Cotransporters 2 in Motoneuronen eines ALS-Mausmodells nachgewiesen werden, was GABAerge und glyzinerge Hemmung verringern und die Exzitotoxizität steigern könnte [Fuchs et al., 2010a]. Des Weiteren wurde in einer späten Krankheitsphase im Mausmodell eine Abnahme der Expression von Transportern für erregende Neurotransmitter gezeigt, bei gleich bleibender Dichte von Transportern für hemmende Transmitter [Schütz, 2005], sowie in Embryonalkultur ein verringerter Strom nach Aktivierung glyzinerger Rezeptoren und eine Expressionsverringering derselben [Chang and Martin, 2011].

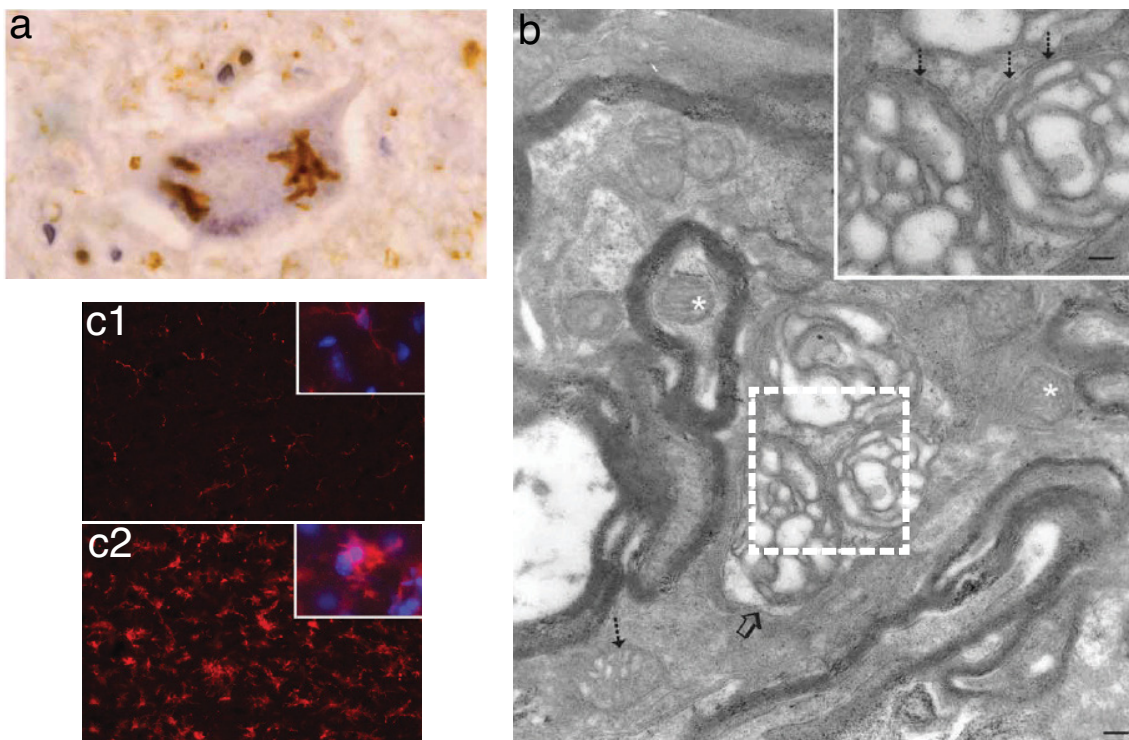


Abbildung 1.3: Morphologisch-histologische Befunde in Motoneuronen bei ALS

Veränderungen der Zellmorphologie lassen Rückschlüsse auf Degenerationsmechanismen zu. (a) Proteinaggregationen, sog. *skein-like inclusions* (braun, Antikörper gegen Ubiquitin) lassen sich in Motoneuronen von ALS-Patienten und Tiermodellen nachweisen (aus [van Welsem et al., 2002]). (b) Elektronenmikroskopischer Nachweis mitochondrialer Schwellungen (Längenmarker $0.3\ \mu\text{m}$). Normale Mitochondrien sind mit * gekennzeichnet. Der offene Pfeil zeigt auf geschwollene Mitochondrien. Der gestrichelte Pfeil weist auf ein Mitochondrium im Anfangsstadium der Schwellung hin. Die Strukturen im weißen Kasten sind in höherer Vergrößerung (Längenmarker $0.15\ \mu\text{m}$) dargestellt. Hier zeigen die gestrichelten Pfeile auf Kontakte der äußeren und inneren Mitochondrienmembran, ein Hinweis auf die Öffnung der mPTP. (aus [Martin et al., 2009]) (c) 1: In einem frühen Stadium der Krankheit (Postnataltag P40, SOD1-G93A Mausmodell) sind Mikrogliazellen in einem Ruhestatus. 2: Im weiteren Verlauf exprimieren sie Marker für eine Aktivierung (*Iba1*, *induction of brown adipocytes 1*, rot) und ändern ihre Morphologie. (aus [Philips and Robberecht, 2011])

Entzündung und Beteiligung von Gliazellen

In Mausmodellen wurde gezeigt, dass eine Expression von mutierter SOD1 einzig in Motoneuronen nicht zu einer Degeneration führt [Pramatarova et al., 2001; Lino et al., 2002]. Nur wenn umgebende Astrozyten ebenfalls, aber nicht ausschließlich [Gong et al., 2000], mutierte SOD1 exprimierten, kam es zum Zelltod. Entzündungsmediatoren wie Tumornekrose-Faktor-Alpha oder ROS aus aktivierter Mikroglia (siehe Abb. 1.3c) und astrozytäre Signalstoffe wie z.B. Adenosin-Triphosphat (ATP) oder Glutamat sind bei ALS freigesetzte Stressoren, die auf evtl. vorgeschädigte Motoneurone toxisch wirken. Diese und weitere Befunde, wie die oben ausgeführte Expressionsverringering astrozytärer Glutamat-transporter, zeigen klar, dass die ALS keine Motoneuron-autonome Krankheit ist. [Boillée

et al., 2006; Barbeito et al., 2010]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass verschiedenste genetische und molekulare Veränderungen in Motoneuronen und umgebenden Gliazellen eine komplexe Interaktion bilden, die auf einer gemeinsamen Endstrecke schließlich zum Absterben von Motoneuronen führt. Eine Diagnosestellung erfolgt in der Regel erst nach der Denervation vieler Muskelfasern, ein therapeutischer Eingriff ist somit erst spät im Degenerationsverlauf möglich. Neben der Ursachenforschung sollte deshalb auch ein Augenmerk auf den pathophysiologischen Veränderungen der Zellen in dieser Endstrecke kurz vor dem Absterben liegen, um zu diesem Zeitpunkt mit Medikamenten ein Fortschreiten verlangsamen zu können. Die vorliegende Arbeit greift mit einer Untersuchung eines Mausmodells im Endstadium der ALS dort an.

1.2.4 Differentielle Vulnerabilität

Zusätzlich sollen in dieser Arbeit Hinweise dafür gefunden werden, wieso primär Motoneurone bei der ALS degenerieren und wieso einige Motoneuronpopulationen weniger vulnerabel als andere sind. So sterben die Neurone des Onuf-Kerns (im Rückenmark, innervieren Darm- und Blasensphinkter) sowie die Motoneurone der Augenmuskelkerne (Ncl. Oculomotorius, Ncl. Abducens) weder beim Menschen noch im Mausmodell ab. Andere bulbäre Populationen wie der Ncl. Hypoglossus oder der Ncl. Facialis und spinale Motoneurone sind dagegen hochvulnerabel [Mannen et al., 1977; Gizzi et al., 1992; Nimchinsky et al., 2000; Haenggeli and Kato, 2002].

Die Größe der Zellen, das lange Axon, ein somit sehr hoher Energiebedarf und eine hohe Expression von Neurofilamenten wurde mit dem Hintergrund von Neurofilamentaggregaten und mitochondrialer Schädigung als eine mögliche Ursache für ein selektives Absterben von Motoneuronen bei der ALS angeführt. [Shaw and Eggett, 2000]

Eine Erklärung für die differentielle Vulnerabilität zwischen Motoneuronpopulationen basiert auf deren unterschiedlicher Calciumhomöostase und entstand somit auf dem Hintergrund der Exzitotoxizitätstheorie. So wurde gezeigt, dass die vulnerablen spinalen und bulbären Motoneurone im Gegensatz zu den resistenten eine sehr geringe Calciumpufferkapazität aufweisen aufgrund von niedriger Expression der Calciumpufferproteine Calbindin-D28K und Parvalbumin (siehe Abb. 1.4a) [Alexianu et al., 1994; Lips and Keller, 1998; Vanselow and Keller, 2000]. Primär hat dies den physiologischen Effekt von schnellen hohen Calciumtransienten nach Stimulation (siehe Abb. 1.4b) und somit einer hohen Flexibilität bei hochfrequenten Aktionen.

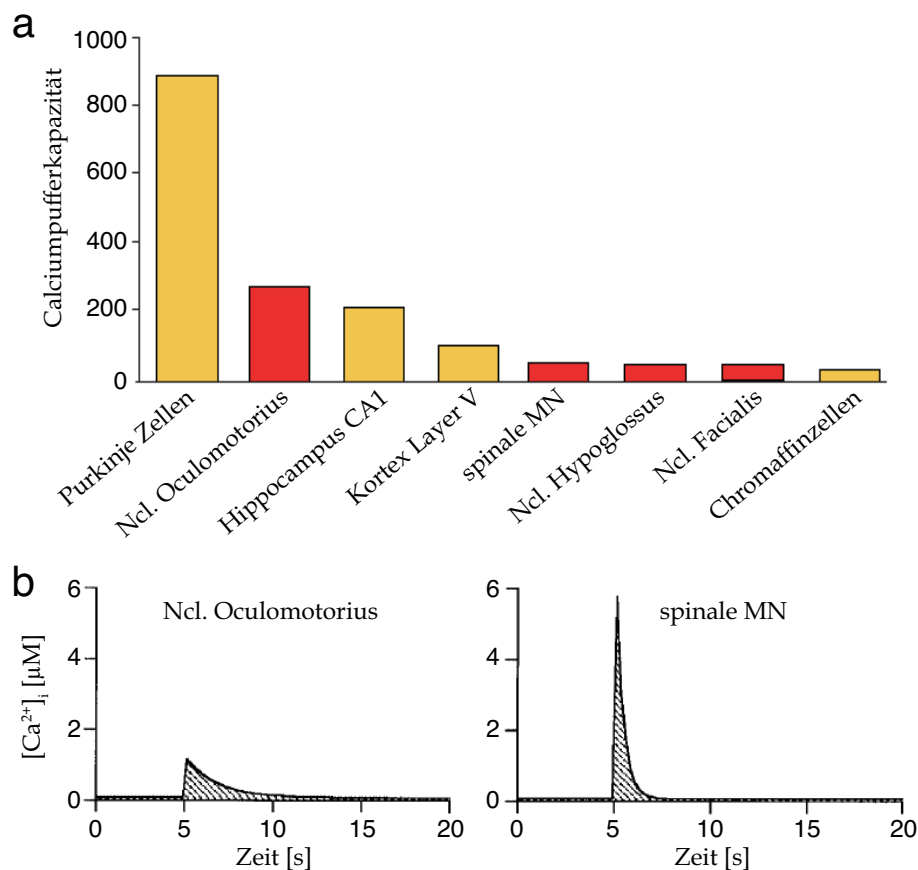


Abbildung 1.4: Calciumhomöostase von resistenten und vulnerablen Motoneuronen

(a) Berechnete Pufferkapazitäten für verschiedene Zelltypen. MN haben generell eine niedrige Calciumpufferkapazität, die resistenten Neurone des Ncl. Oculomotorius aber eine fünfmal höhere als die vulnerablen MN aus Spinalmark und Hirnstamm. (verändert aus [von Lewinski and Keller, 2005]) (b) Simulation der Calciumantwort von Motoneuronen im Ncl. Oculomotorius und Spinalmark auf den gleichen Calciuminflux. Die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht sich deutlich stärker in vulnerablen Motoneuronen, allerdings mit schnellerer Zeitkonstante der Erholung des Signals. (verändert aus [Vanselow and Keller, 2000])

Eine langfristig hohe Konzentration freien Calciums kann jedoch pathologische Veränderungen wie die Aktivierung von Proteasen oder die Schädigung von Mitochondrien hervorrufen. Eine Relevanz bei ALS gilt als erwiesen, da durch Überexpression von Calbindin oder Parvalbumin in Kultur eine Neurodegeneration verhindert oder in einem Mausmodell der ALS der Symptombeginn herausgezögert werden konnte [Ho et al., 1996; Beers et al., 2001]. (Für einen Übersichtsartikel siehe [von Lewinski and Keller, 2005])

Zusätzlich gibt es eine differentielle Vulnerabilität der Motoneuronsubtypen in einer Population. Typ FF Motoneurone sind als erstes von der Degeneration betroffen, Typ S sind resistenter, sprossen aus und reinnervieren viele Typ IIb Muskelfasern [Pun et al., 2006; Hegedus et al., 2008]. Ein Erklärungsansatz hierfür ist der größere Zellkörper der FF MN mit höherem Energieverbrauch sowie deren phasisches Entladungsverhalten mit hohen Cal-

ciumspitzen im Gegensatz zu einer tonischen Entladung mit Calciumplateau auf niedrigem Niveau bei Typ S.

1.2.5 Therapie

Trotz der umfassenden Hinweise auf verschiedene zytotoxische Veränderungen in Motoneuronen bei der ALS konnte bisher keine kurative Therapie gefunden werden. Nach den Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie [DGN, 2011] wird vor allem symptomatisch behandelt, z.B. mit Physiotherapie und Logopädie und gegebenenfalls auch maschineller Unterstützung der Atmung und künstlicher Ernährung. Das einzige empfohlene Medikament mit leichten lebensverlängernden Eigenschaften ist Riluzol [Bensimon et al., 1994]. Eine Verringerung der Glutamatexzitotoxizität wird als dessen Wirkmechanismus angenommen. So konnte gezeigt werden, dass Riluzol präsynaptische NMDA-Rezeptoren und spannungsabhängige Natriumkanäle inhibiert und somit zu einer verringerten Glutamatausschüttung auf Motoneurone führt [Lamanauskas and Nistri, 2008]. Postsynaptisch werden AMPA-Rezeptoren blockiert [Albo et al., 2004]. Außerdem wurde in elektrophysiologischen Studien nachgewiesen, dass Riluzol persistierende Natrium- und Calciumkanäle blockiert und somit die Erregbarkeit der Motoneurone verringert [Huang et al., 1997; Song et al., 1997; Kuo et al., 2006].

Bei weiteren therapeutischen Versuchen, eine Exzitotoxizität, oxidativen Stress, Apoptose oder Entzündungen einzudämmen, konnte über Mausmodelle hinaus bisher kein Erfolg verzeichnet werden, viele Pharmaka sind aber noch in der klinischen Testung. Neuester Angriffspunkt ist die Abbaumaschinerie fehlgefalteter Proteine [Deng et al., 2011]. Weitere intensive Ursachenforschung, vor allem in fortgeschrittenen Krankheitsstadien der Mausmodelle ist nötig und sollte mit dieser Arbeit vorangetrieben werden. [Carlesi et al., 2011]

1.2.6 Tiermodelle zur Grundlagenforschung

1.2.6.1 Tiermodelle der ALS

Wie bereits mehrfach erwähnt, sind genetisch modifizierte Tiere ein Hilfsmittel für die Ursachenforschung und die Entwicklung von Therapien bei der ALS. Oft wurden bei auffälligen Tieren spontane Mutationen entdeckt, die zu einer Motoneurondegeneration oder Muskelatrophie führten. Diese Mäuse (z.B. *wobbler*, *nmd* (neuro-muskuläre Degeneration), *pmn* (progressive motorische Neuropathie)) zeigen aber in der Regel kein motoneuronspezifisches Degenerationsmuster und sterben früh postnatal. Bessere Modelle konnten nach der Entdeckung von humanen krankheitsverursachenden Mutationen entwickelt werden. So entstanden unter anderem Mäuse mit Deletion des Alsin- oder des FUS/TLS Gens, die allerdings keine Motoneurondegeneration aufwiesen, und transgene Mäuse und Ratten mit mutiertem Dynactin und verschiedenen Mutationen von SOD1 oder TDP-43. [Van

Den Bosch, 2011])

Vor allem die SOD1-transgenen Mäuse zeigen viele, mit der humanen Krankheit vergleichbare Symptome und sind trotz Zweifel an der Übertragbarkeit auf sporadische und andere familiäre Formen [Kiernan et al., 2011; Van Den Bosch, 2011] das bestuntersuchte ALS-Mausmodell. Eine der Mauslinien mit transgenem SOD1 mit Mutation an Position 93 (G93A) wurde für die vorliegende Arbeit verwendet und soll deshalb näher beschrieben werden.

1.2.6.2 Charakterisierung des SOD1-G93A Mausmodells

Die SOD1-G93A Mauslinie wurde 1994 von Gurney und Kollegen generiert [Gurney et al., 1994]. Diese Mäuse tragen etwa 18 Kopien des Transgens aus der humanen mutierten Form des SOD1-Gens mit der *gain-of-function*-Mutation G93A (Austausch der Aminosäure Glyzin zu Alanin an Position 93) unter dem humanen SOD1-Promotor. Die Tiere entwickeln Symptome, die der humanen ALS ähnlich sind. Es kommt im Verlauf der Krankheit zu einer Degeneration der sekundären Motoneurone [Gurney et al., 1994], sowie der kortikospinalen und kortikobulbären Innervation [Zang and Cheema, 2002]. Im Endstadium konnte eine Abnahme der Motoneuronzahl im Spinalmark auf unter 50% beschrieben werden [Jaarsma et al., 1996; Kieran et al., 2004]. In den bulbären Kernen (Ncl. Facialis, Ncl. Hypoglossus) wurde nur eine Abnahme um 20-30% beobachtet [Haenggeli and Kato, 2002] (siehe Abb. 1.5a). In Folge dessen entwickelt sich eine Muskelschwäche und Lähmungen der Hinterläufe, der Vorderläufe und der bulbär innervierten Muskelgruppen (siehe Abb. 1.5c). Wie beim Menschen bleiben auch in diesem Mausmodell die Augenmuskelkerne weitestgehend ausgespart [Haenggeli and Kato, 2002]. Auch wenn schon ab Postnataltag P40 Auffälligkeiten berichtet wurden [Alves et al., 2011], werden erste deutliche Lähmungserscheinungen der Hinterläufe, erfasst mit einem Rotarod-Test, etwa ab P70 [Smittkamp et al., 2008] bis P90 [Mancuso et al., 2011a] messbar. Eine Schwächung der Zungenmuskulatur wurde von uns ab P77 [Fuchs et al., 2010a] (siehe Abb. 1.5d) von anderen ab P100 [Smittkamp et al., 2008] registriert. Die G93A Mäuse sterben mit etwa P130.

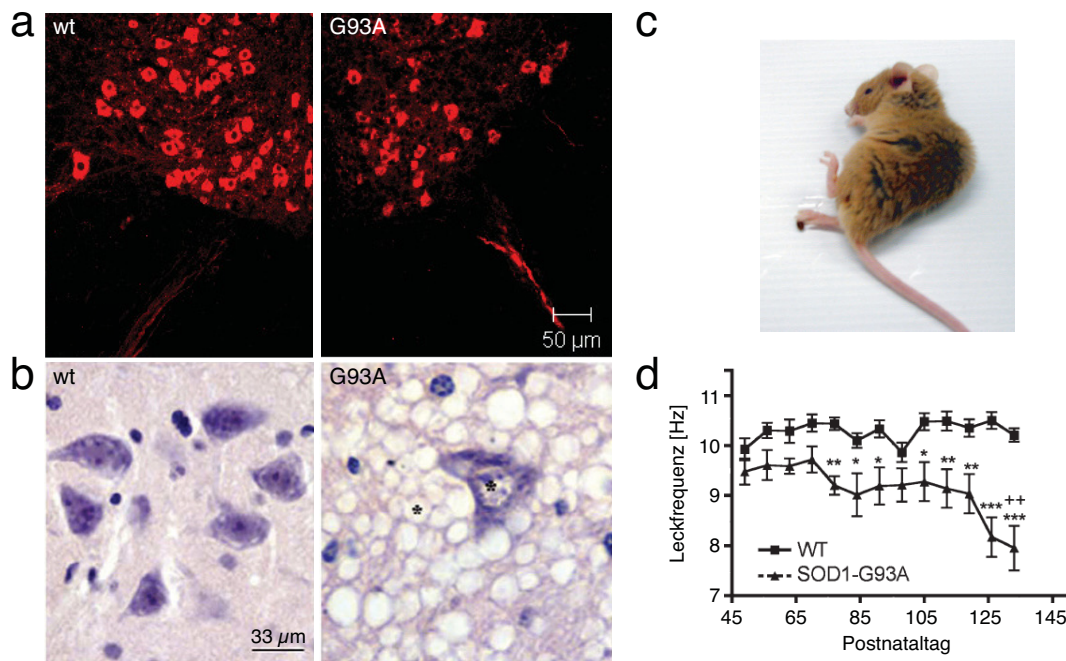


Abbildung 1.5: Charakterisierung des SOD1-G93A ALS-Mausmodells

Eine Degeneration von Motoneuronen führt zu Muskelschwäche und Atrophie. (a) Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Cholin-Acetyltransferase (ChAT). Im Ncl. Hypoglossus von G93A Mäusen sind im Endstadium etwa 30% der Neurone degeneriert. (aufgenommen mit LSM 5, Zeiss, Göttingen) (b) Hämatoxylin-Eosin-Färbung von hypoglossalen Motoneuronen in G93A Mäusen. Es kommt zu einer Ausbildung von Vakuolen aufgrund von mitochondrialer Schädigung. (verändert aus [Ferrucci et al., 2010]) (c) SOD1-G93A Maus im Alter von 125 Tagen. Die Hinterläufe sind vollständig gelähmt. Die Maus kann sich nicht mehr aufrichten. (aus [Kieran et al., 2004]). (d) Leckfrequenz pro Alter der G93A Mäuse und Wildtypkontrollen. Durch die Degeneration von Motoneuronen im Ncl. Hypoglossus kommt es ab etwa P77 zu einer Schwäche der Zungenmuskulatur, die sich in einer verlangsamten Leckfrequenz ausdrückt. (verändert aus [Fuchs et al., 2010a])

1.3 Physiologie und Pathophysiologie von Motoneuronen

Übererregbarkeit, Exzitotoxizität und mitochondriale Schädigung sind die am besten untersuchten Degenerationsmechanismen bei ALS. Durch diese werden Motoneurone in ihrer Funktion beeinträchtigt. Wie weit diese Beeinträchtigung im Endstadium der Krankheit geht und was letztlich zum Absterben führt ist aber wenig erforscht, da eine Analyse im adulten Tiermodell auf Einzelzellebene technisch schwierig ist. Dies war eine Aufgabe der vorliegenden Arbeit. Um die erworbenen Erkenntnisse einordnen zu können, soll daher zunächst im Folgenden die intrinsische physiologische Funktion von Motoneuronen, beschränkt auf Elektrophysiologie und Calciumhomöostase, zusammengefasst und auf die bisher bekannten Änderungen dieser während des Krankheitsverlaufs der ALS hingewiesen werden.

1.3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von Motoneuronen

Ein Aktionspotential in Motoneuronen führt zu einer Ausschüttung des Neurotransmitters Acetylcholin an der neuromuskulären Synapse und zu einer Kontraktion von Muskelfasern. Eine Reihe von Aktionspotentialen führt zur Muskelbewegung. Feinste Bewegungsänderungen wie etwa beim Spielen eines Musikinstrumentes im Gegensatz zu groben Haltearbeiten beim Tragen schwerer Lasten machen es aber nötig, dass dieses Alles-oder-Nichts-Signal sinnvoll integriert und örtlich und zeitlich präzise generiert wird. Hierfür exprimieren die unterschiedlichen Motoneuronsubtypen bestimmte Ionenkanäle und Transporter, deren Zusammensetzung sich im Laufe der Entwicklung des motorischen Systems ändert. Des Weiteren sind Motoneurone in ein regulatorisches Netzwerk eingegliedert, welches die Aktivität steuert und moduliert.

1.3.1.1 Kanäle und Entladungseigenschaften

Abb. 1.6 zeigt ein typisches Aktionspotential (AP) eines adulten spinalen Motoneurons und die für die einzelnen Phasen zuständigen Kanäle. Die genauen Kanalsubtypen basieren z.T. auf Vermutungen und Modellen [Purvis and Butera, 2005; Brownstone and Stuart, 2011]. Einige molekulare Nachweise sind jedoch vorhanden [Alessandri-Haber et al., 2002; Gunasekaran et al., 2009; Sukiasyan et al., 2009] und die Ströme lassen sich experimentell beobachten. So wurden z.B. in Motoneuronen früh postnataler Mäuse und Ratten L-, T-, N-, P/Q- und R-Typ Calciumströme isoliert [Viana et al., 1993a; Umemiya and Berger, 1994; Carlin et al., 2000a]. Besonders die L-Typ Calciumkanäle mit persistierenden Strömen und niedriger Aktivierungsschwelle gerieten in den Fokus bei der ALS-Forschung (siehe 1.3.1.3). In Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus von Ratten wurden apaminsensitive, calciumaktivierte Kaliumkanäle (SK) während der Nachhyperpolarisation (AHP) der Aktionspotentiale nachgewiesen (siehe Abb. 1.7a) [Viana et al., 1993b; Lape and Nistri, 2000], im Spinalmark die calcium- und spannungsaktivierten Kaliumkanäle mit größerer Leitfähigkeit (BK) [Safronov and Vogel, 1998]. Verzögert rektifizierende und A-Typ Kaliumkanäle sowie TTX-sensitive spannungsabhängige Natriumkanäle sind in spinalen Motoneuronen von jungen Ratten und Mäusen genau analysiert worden [Safronov and Vogel, 1995; Carlin et al., 2008]. Einen Einfluss auf das Ruhemembranpotential hat ein großer hyperpolarisationsaktivierter Kationenstrom (HCN, siehe Abb. 1.7b) [Bayliss et al., 1994]. (Für einen Übersichtsartikel siehe [Rekling et al., 2000])

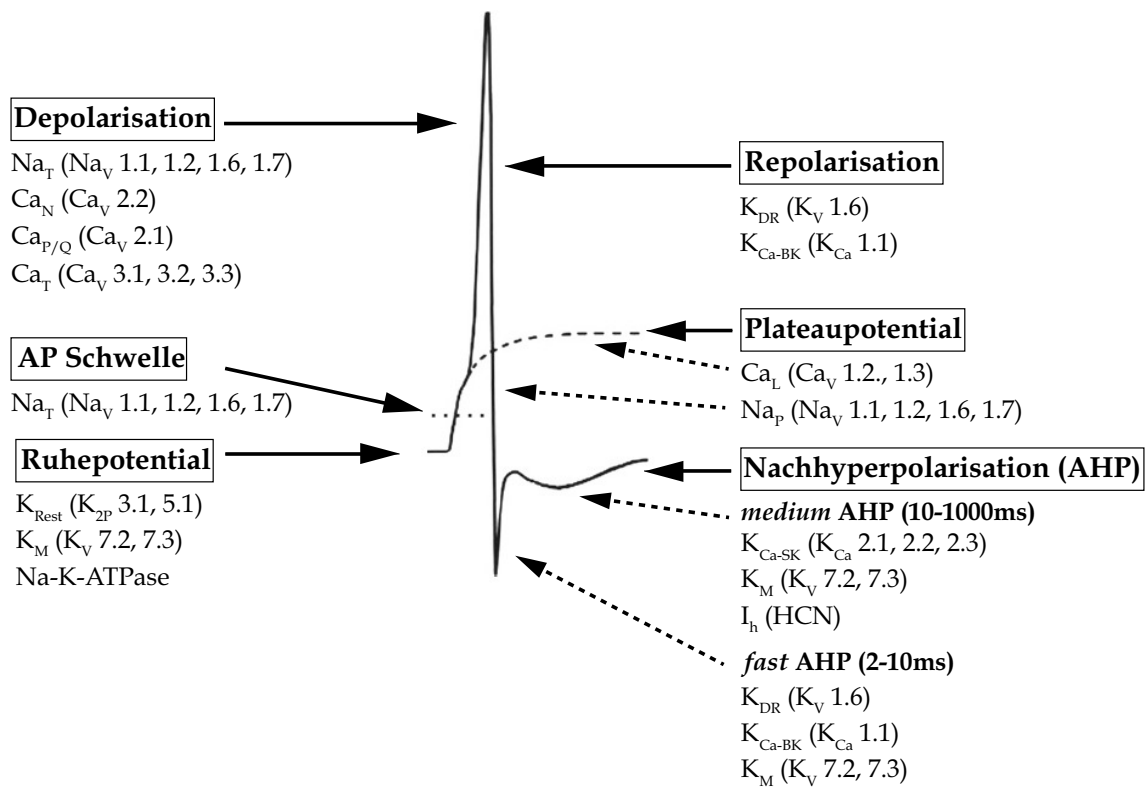


Abbildung 1.6: Ionenkanäle in Motoneuronen

Darstellung eines typischen Motoneuron-Aktionspotentials mit beteiligten Kanälen. Ca_L : persistierender Calciumstrom, langsam aktivierend, niedrige Schwelle, Ca_N : Calciumstrom, intermediäre Eigenschaften, $\text{Ca}_{P/Q}$: transienter Calciumstrom, hohe Schwelle, Ca_T : transienter Calciumstrom, niedrige Schwelle, I_h : hyperpolarisationsaktivierter Kationenstrom, $\text{K}_{\text{Ca-BK}}$: calciumaktivierter Kaliumstrom, hohe Leitfähigkeit, $\text{K}_{\text{Ca-SK}}$: calciumaktivierter Kaliumstrom, geringe Leitfähigkeit, K_{DR} : schneller, verzögert rektifizierender Kaliumstrom, K_M : langsamer Kaliumstrom, niedrige Aktivierungsschwelle, muskarinsensitiv, K_{Rest} : Leck-Kaliumstrom bei Ruhe, Na_P : persistierender Natriumstrom, niedrige Aktivierungsschwelle, Na_T : transienter schneller Natriumstrom (verändert aus [Brownstone and Stuart, 2011])

Dieser Kanalbesatz der Motoneurone führt zu typischen Entladungseigenschaften. Frühe Studien an spinalen Motoneuronen von Katzen und Schildkröten zeigten die Möglichkeit einer repetitiven, hochfrequenten Entladung (>200 Hz [Kernell, 1965]), Frequenzadaptation zum Beginn einer Stimulation (siehe Abb. 1.7c) und kurze Aktionspotentiale mit schneller und mittlerer Nachhyperpolarisation (fAHP und mAHP) [Adrian and Bronk, 1929; Kernell, 1965; Hounsgaard et al., 1988; Hounsgaard and Mintz, 1988]. In Nagern konnten diese Eigenschaften qualitativ bestätigt werden [Viana et al., 1995; Carlin et al., 2000a; Lape and Nistri, 2000; Meehan et al., 2010b; Mitra and Brownstone, 2011], einzelne Parameter sind in ihrem Betrag aber speziesspezifisch unterschiedlich. In spinalen Motoneuronen von Mäusen konnten z.B. Aktionspotentialfrequenzen über 300 Hz gemessen werden [Meehan et al., 2010b]. Aktionspotentiale und deren Nachhyperpolarisation in Mäusen sind kürzer als in Katzen [Manuel et al., 2009]. Innerhalb einer Spezies konnten Unterschiede in

den verschiedenen Motoneuronsubtypen beobachtet werden. Entsprechend ihrer physiologischen Funktion können Typ FF Motoneurone in höheren Frequenzen Aktionspotentiale generieren als Typ S und erreichen dies durch eine kürzere Nachhyperpolarisation. Der Zugangswiderstand von Typ S Motoneuronen ist deutlich größer als der der schnellen Typen und die Rheobase (Strom, der nötig ist zum Auslösen eines Aktionspotentials) dementsprechend niedriger [Gardiner, 1993].

Typisch für Typ S und evtl. auch Typ FR spinale Motoneurone ist zudem die Ausbildung von Plateaupotentialen und ein bistabiles Verhalten, eine anhaltende Entladung nach kurzer Stimulation über das Ende der Stimulation hinaus (siehe Abb. 1.7e) [Hounsgaard et al., 1988; Lee and Heckman, 1998b; Bennett et al., 2001b]. Dieses wird generiert durch persistierende Calciumströme durch L-Typ spannungsabhängige Calciumkanäle sowie persistierende Natriumströme (siehe Abb. 1.7d) und trägt zu einer energiesparenden nicht-ermüdenden Muskelkontraktion bei [Hounsgaard and Kiehn, 1989; Lee and Heckman, 1998a; Carlin et al., 2000b; Li and Bennett, 2003].

Veränderung der Eigenschaften während der Entwicklung

Die meisten elektrophysiologischen Analysen von Motoneuroneigenschaften bei Ratten und Mäusen wurden an Zellkulturen, Embryonen oder früh postnatalen Tieren (<P20) durchgeführt. Dabei wurden starke Veränderungen der Eigenschaften schon zwischen der ersten und der zweiten postnatalen Woche beschrieben. Diese Entwicklung setzte sich bis zu einem adulten Stadium (<P68) fort [Mitra and Brownstone, 2011]. Mehrere unabhängige Publikationen beschrieben eine Abnahme des Zugangswiderstands gekoppelt mit einer Zunahme der Rheobase und eine Zunahme des Stroms durch hyperpolarisationsaktivierete Kationenkanäle. Des Weiteren werden die Aktionspotentiale deutlich schneller und die Nachhyperpolarisation signifikant kürzer [Bayliss et al., 1994; Viana et al., 1994; Berger et al., 1996; Carrascal et al., 2005; Nakanishi and Whelan, 2010; Mitra and Brownstone, 2011; Quinlan et al., 2011].

Aufgedeckt wurde auch eine Abnahme von T-Typ Calciumkanälen und eine Zunahme von L-Typ Calciumkanälen, persistierenden Natriumkanälen und Bistabilität [Berger et al., 1996; Perrier and Hounsgaard, 2000; Quinlan et al., 2011]. Eine schnellere Erholung aus der Inaktivierung zeigen Natriumkanäle in älteren Tieren. Die folgende höhere Stromdichte und mehr verfügbare Kanäle führen zu einer gesteigerten Maximalfrequenz [Carlin et al., 2008].

Eine Studie zur Entwicklung der Parameter über einen größeren Zeitraum fehlt. Ein Vergleich der bei der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten in adulten Mäuse (bis P138) mit den bisher bekannten Daten aus juvenilen Tieren wird unter 4.2.1 vorgenommen.

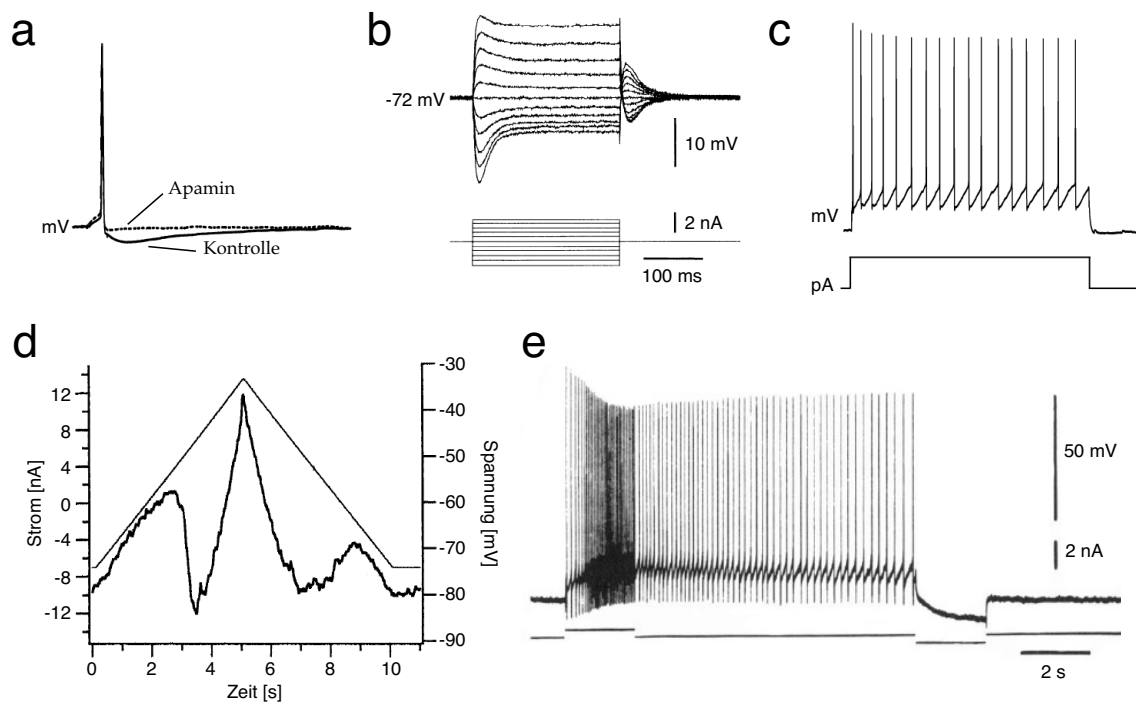


Abbildung 1.7: Entladungseigenschaften von Motoneuronen

(a) Typisches Aktionspotential eines Motoneurons mit fAHP und mAHP. Die mAHP verschwindet durch die Blockade von SK-Kanälen mittels Apamin. (verändert aus [Miles et al., 2005]) (b) Eine Hyperpolarisation von Motoneuronen führt zur Öffnung von hyperpolarisationsaktivierten Kationenkanälen, die eine Depolarisation bewirken. (verändert aus [Bayliss et al., 1994]) (c) Motoneurone zeigen repetitive, hochfrequente Aktionspotentiale mit einer anfänglichen Frequenzadaptation. (verändert aus [Miles et al., 2005]) (d) Die Applikation einer langsamen Spannungsrampe generiert in Motoneuronen persistierende Einwärtsströme (PIC) durch Calcium- und Natriumkanäle. (verändert aus [Lee and Heckman, 1998a]) (e) PIC tragen zur Bistabilität von Motoneuronen bei. Bei Wegnahme des Stimulus generiert die Zelle weiterhin Aktionspotentiale. (verändert aus [Hounsgaard and Kiehn, 1989])

1.3.1.2 Eingliederung in das Netzwerk

Im lebenden Organismus sind Motoneurone natürlich nicht isoliert, sondern in ein umfassendes Neuronennetzwerk eingegliedert. Sie erhalten Signale, die eine Erregung veranlassen und Signale, die ihre Erregbarkeit an den Bedarf anpassen und die intrinsischen Eigenschaften modulieren. Erregende und hemmende direkte Impulse für präzise Willkürbewegungen kommen vom Kortex oder von Muskelspindeln und werden über lokale Prämotoneurone und Interneurone vermittelt. Vor allem auf spinaler Ebene entsteht so ein teilweise autonomes Netzwerk zur Haltekontrolle und alternierenden Bewegungen (*central pattern generator*). Die Neurotransmitter dabei sind Glutamat, GABA und Glyzin, die auf ionotrope Rezeptoren an den Motoneuronen wirken. Im Gegensatz zu spinalen Motoneuronen werden Neurone des Ncl. Hypoglossus nicht rekurrent von Renshaw-Zellen inhibiert.

Neben diesen Hauptwegen gibt es auch viele modulierende Einflüsse vor allem von serotonergen Neuronen aus dem Ncl. Raphe und noradrenergen Neuronen aus dem Locus Coeruleus.

leus, die über metabotrope Rezeptoren die Erregbarkeit der MN steigern oder vermindern können, je nach Aufmerksamkeitsstatus oder vegetativem Zustand des Organismus. Diese modulatorischen Einflüsse sind für die Erregbarkeit eines Motoneurons deutlich wichtiger als der eigentliche erregende Impuls glutamaterger Prämotoneurone. So wurde mittels Computersimulation gezeigt, dass sich die Erregbarkeit eines spinalen Motoneurons um ein Fünffaches steigern lässt, kommt es in Kontakt mit Serotonin und Noradrenalin [Heckman et al., 2009]. Hauptverantwortlich dafür ist die Signalkaskade nach Aktivierung des 5-HT₂ Serotoninrezeptors, an deren Ende eine Verstärkung persistierender Einwärtsströme steht [Perrier and Hounsgaard, 2003; Harvey et al., 2006]. Auch das bistabile Verhalten ist serotoninabhängig [Hounsgaard and Kiehn, 1989]. (Für Übersichtsartikel siehe [Rekling et al., 2000; Heckman et al., 2009])

Klinisch ist dieser Modulationsweg wichtig für das Verständnis der Entwicklung von Spastik bei Querschnittslähmungen [Bennett et al., 2001a; Li and Bennett, 2003]. Aber auch bei ALS wird eine Verstärkung der Exzitotoxizität durch Serotonin diskutiert [Sandyk, 2006] und persistierende Einwärtsströme stehen im Fokus der Forschung.

1.3.1.3 Elektrophysiologische Eigenschaften von Motoneuronen bei ALS

Messungen von axonaler Leitfähigkeit und Muskelaktionspotentialen bei humanen ALS-Patienten lieferten Hinweise für eine Übererregbarkeit aufgrund von verstärkten persistierenden Natriumeinwärtsströmen. Diese und weitere Hinweise auf eine verringerte Kaliumleitfähigkeit könnten die bei ALS auftretenden Faszikulationen erklären [Bostock et al., 1995; Mogyoros et al., 1998; Kanai et al., 2006; Vucic and Kiernan, 2006a]. Auch im Mausmodell wurde mehrfach Übererregbarkeit und höhere Maximalfrequenz von primären und sekundären Motoneuronen diskutiert und als deren Ursache ein verstärkter persistierender Natriumeinstrom gezeigt (siehe Abb. 1.8a,b) [Kuo et al., 2005; van Zundert et al., 2008; Pieri et al., 2009; Meehan et al., 2010a; Quinlan et al., 2011]. Quinlan und Kollegen diskutierten, dass sich auch während der Entwicklung von gesunden Wildtypmäusen der persistierende Natriumstrom steigert, ein Unterschied des PIC bei SOD1-G93A Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen daher evtl. durch eine schnellere Reifung bei den transgenen Tieren zustande kommt [Quinlan et al., 2011]. Darauf weisen auch die Beobachtungen einer anderen Arbeitsgruppe hin, die einen weiter verzweigten, stärker entwickelten Dendritenbaum im ALS-Mausmodell während der zweiten postnatalen Woche beobachtete (siehe Abb. 1.8c) [Amendola et al., 2007; Elbasiouny et al., 2010]. Als einen weiteren Grund für die Übererregbarkeit der Motoneurone bei ALS wurde eine schnellere Erholung aus der Inaktivierung bei spannungsabhängigen Natriumkanälen diskutiert, die eine höhere Maximalfrequenz ermöglichte [Zona et al., 2006].

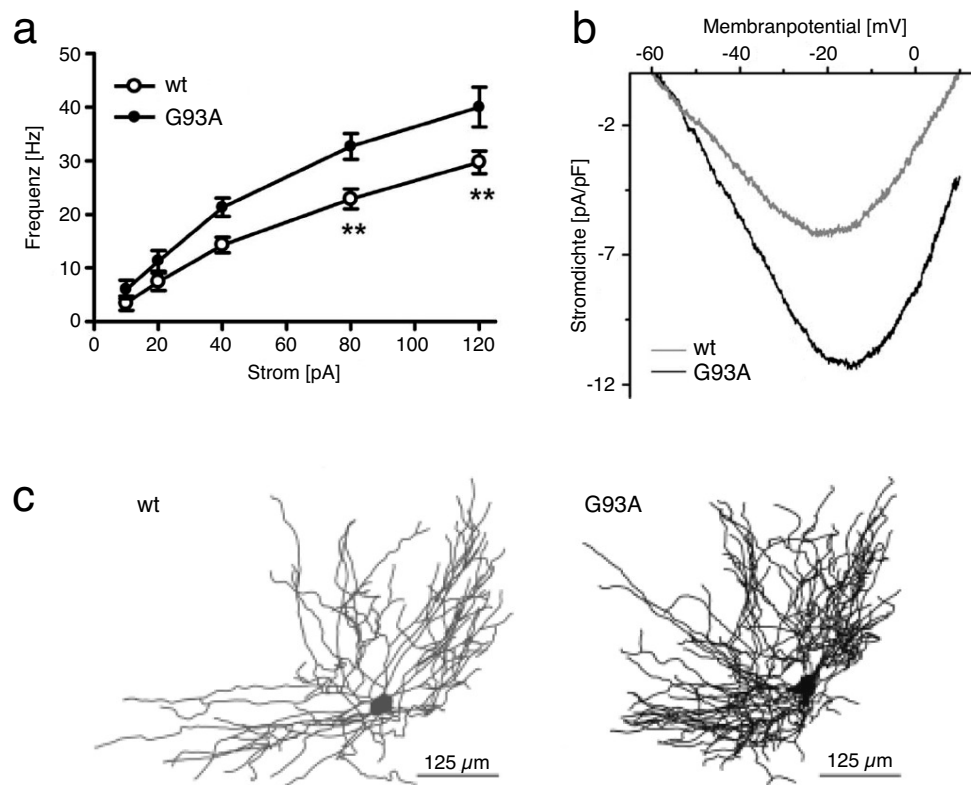


Abbildung 1.8: Übererregbarkeit der Motoneurone bei ALS

(a) Frequenz-Strom-Kurve von hypoglossalen MN aus Mäusen im Alter von P4-P10. Die Steigung der Kurve ist größer in G93A MN, die Erregbarkeit somit erhöht. **: Signifikanzniveau von $p < 0.01$ mit Student's t-Test (verändert aus [van Zundert et al., 2008]) (b) Persistierende Natriumeinwärtsströme sind größer in G93A hypoglossalen MN aus Mäusen im Alter von P4-P10 was die Übererregbarkeit erklären könnte. (verändert aus [van Zundert et al., 2008]) (c) Rekonstruktion von während einer Messung gefüllten Motoneuronen des Spinalmarks aus Mäusen im Alter von P8 (wt) und P9 (G93A). Der Dendritenbaum von G93A Mäusen ist trotz etwa gleichen Alters deutlich weiter entwickelt und komplexer. Dies ist ein Hinweis auf eine schnellere Entwicklung von Motoneuronen im ALS-Mausmodell. (verändert aus [Amendola et al., 2007])

Die Analyse weiterer passiver und aktiver Eigenschaften der Motoneurone im ALS-Mausmodell gab kein solch klares Bild. Eingangswiderstand, Rheobase, Ruhemembranpotential, Aktionspotentialform und AHP-Dauer wurden z.T. als unverändert, z.T. als vom Betrag kleiner oder größer beschrieben [Pieri et al., 2003; Kuo et al., 2004, 2005; Amendola et al., 2007; Bories et al., 2007; van Zundert et al., 2008; Pambo-Pambo et al., 2009; Pieri et al., 2009; Quinlan et al., 2011]. Diese Unterschiede sind womöglich auf die unterschiedlichen Präparationen und Experimentalbedingungen, unterschiedliches Alter der Tiere oder andere Versionen der SOD1-Mutation zurückzuführen. So fanden sich bei der G85R-Mutation deutlich weniger Unterschiede zum wt als bei dem in der gleichen Studie analysierten Stamm mit einer geringen Kopienzahl der G93A Mutation [Pambo-Pambo et al., 2009]. Die bei den humanen Messungen gefundenen axonalen Veränderungen ließen sich im Maus-

modell bei einer Studie gar nicht nachvollziehen, was zum Anzweifeln der Brauchbarkeit des SOD1-Mausmodells führte [Boërio et al., 2010]. In einer anderen Studie über die Leitfähigkeitseigenschaften der Axone im Mausmodell konnten aber sowohl pathologische Veränderungen in den sekundären als auch in den primären Motoneuronen gezeigt werden [Mancuso et al., 2011b].

Eine weiterführende Untersuchung zur definitiven Beschreibung der elektrophysiologischen Eigenschaften von Motoneuronen im ALS-Mausmodell ist deshalb nötig. Auch wurden die meisten der murinen Daten in Kulturen embryonaler Rückenmarksmotoneurone oder in Gewebeschnitten postnataler Mäuse bis P10 gewonnen. Die Veränderungen der elektrophysiologischen Parameter während der Entwicklung des motorischen Systems und die Unterschiede in der Geschwindigkeit der Entwicklung der ALS-Tiere kann zwar mit der gezeigten Übererregbarkeit einen Hinweis für die Degenerationsursache geben, eine definitive Aussage ist aber nur möglich, wenn man die Parameter im weiteren Verlauf der Krankheit beschreibt und auch im Endstadium Daten erhebt. Dies war ein Ziel der vorliegenden Arbeit.

1.3.2 Calciumhomöostase in Motoneuronen

Während der Aktionspotentiale und auch bei synaptischer Aktivierung ionotroper und metabotroper Rezeptoren gelangt Calcium in das Motoneuron. Diese Ionen depolarisieren das Neuron und führen zur Aktivierung vielfältiger Signalkaskaden, wie etwa einer synaptischen Verstärkung, der Ausschüttung von Neurotransmittern an der neuromuskulären Endplatte, der Modulation calciumabhängiger Kanäle und Transporter oder der Regulation der Aktionspotentialgenerierung durch die Aktivierung calciumabhängiger Kaliumkanäle [Viana et al., 1993a,b]. Aber auch apoptoseinduzierende Enzyme wie Calpain werden durch Calcium aktiviert und so muss eine Zelle zum Selbstschutz und zur Beendigung der Signalkaskaden Calcium an Pufferproteine binden und in intrazelluläre Speicher oder aus der Zelle hinaus transportieren.

Wie bereits in 1.2.4 ausgeführt, exprimieren Motoneurone kaum Calciumpufferproteine wie Calbinin-D28K oder Parvalbumin. Ihnen bleibt somit nur der Transport von Calcium über die Plasmamembran, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) und in Mitochondrien, deren Membranen für Calcium spezifische Transportproteine exprimieren. Für die bei ALS diskutierte Calciumüberladung ist entweder ein verstärkter Calciumeinstrom oder eine verringerte Extrusion und Speicherkapazität ursächlich. Die Wege der Extrusion von Calcium aus Motoneuronen, die Aufnahme in intrazelluläre Speicher und die Wege des Calciums in die Zelle hinein sind in Abb. 1.9 schematisch dargestellt und sollen im Folgenden erläutert, sowie die bisherigen Befunde der Calciumhomöostase bei ALS beschrieben werden.

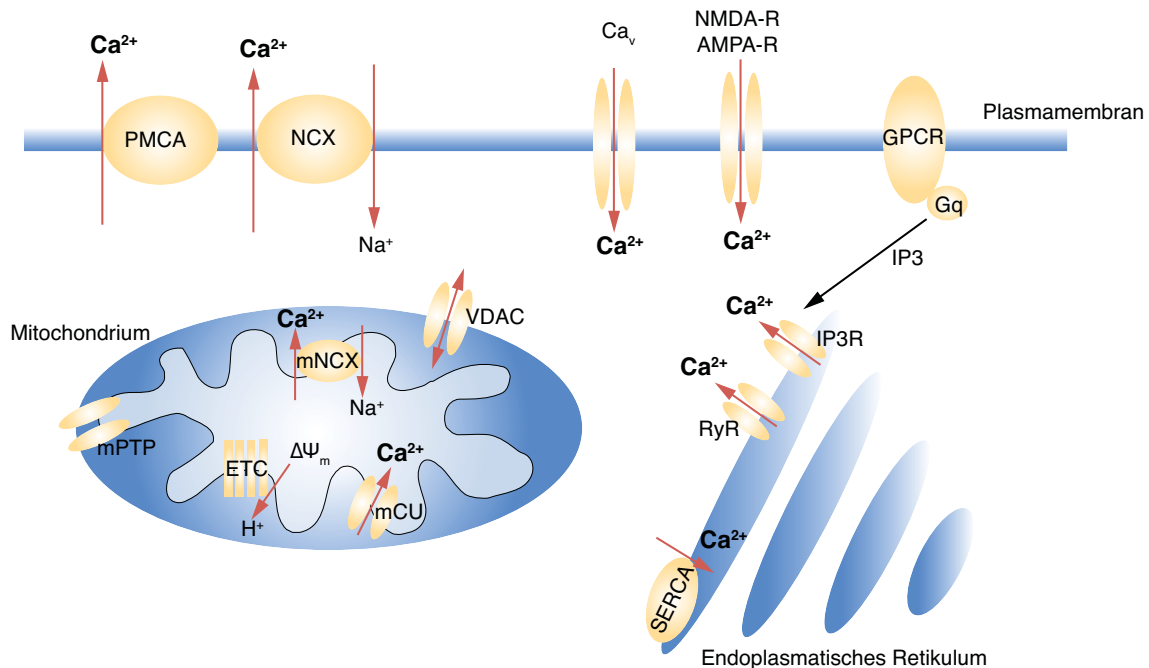


Abbildung 1.9: Calciumhomöostase in Motoneuronen

Schematische Darstellung der Calciumquellen und wichtigsten Calciumtransportwege. Über spannungsgesteuerte Calciumkanäle (Ca_v), Glutamaterezeptoren (NMDA-R, AMPA-R) und intrazelluläre Signalkaskaden gelangt Calcium in das Zytosol. Dieses wird dann in Mitochondrien oder dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) gespeichert oder über die Plasmamembran entfernt. Für alle Transportwege gibt es spezifische Transportproteine, die Triebkraft für den Transport in die Mitochondrien ist ein matrixnegatives Potential ($\Delta\Psi_m$). ETC: Elektronentransportkette, GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor, Gq: G-Protein Typ q, IP₃: Inositoltrisphosphat, IP₃R: IP₃-Rezeptor, mCU: mitochondrialer Calciumuniporter, mNCX: mitochondrialer Natrium-Calcium-Austauscher, mPTP: mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore, NCX: Natrium-Calcium-Austauscher, PMCA: Plasmamembran-Calcium-ATPase, RyR: Ryanodinrezeptor, SERCA: Sarko-Endoplasmatisches Retikulum Calcium-ATPase, VDAC: Spannungsabhängiger Anionenkanal

1.3.2.1 Calciumquellen in Motoneuronen

Mit der Kombination aus elektrophysiologischen Messungen und fluorometrischer Bestimmung der Calciumkonzentration konnte im Ncl. Hypoglossus während einer physiologischen Aktivität der Motoneurone ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration um bis zu 100 nM im Soma und um 200 nM in den Dendriten beobachtet werden (siehe Abb. 1.10) [Lips and Keller, 1999; Ladewig and Keller, 2000]. Die Aktivität entsprach einer oszillatorischen Generierung von Gruppen von Aktionspotentialen, die als inspiratorisches Signal etwa zweimal pro Sekunde durch die Innervierung aus dem respiratorischen Prä-Bötzinger-Komplex in diesem Kern entsteht. Aus den Signalen wurde ein intrazellulärer Calciumanstieg von 2.4 nM pro Aktionspotential berechnet. Nötig für den Calciumeinstrom war eine Depolarisation der Membran, die verschiedene Subtypen spannungsaktivierter Calciumkanäle öffnet. Diese Kanäle stellen somit eine entscheidende Quelle für Calcium in

Motoneuronen dar.

Außerdem wurden exzitatorische synaptische Potentiale gemessen, die einen Calciumkonzentrationsanstieg von maximal 20 nM hervorriefen und auf die Öffnung von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- oder AMPA-Glutamatrezeptoren zurückzuführen waren [Lips and Keller, 1999; Jahn et al., 2006]. Die Calciumerhöhung durch die Öffnung eines NMDA-Rezeptors wurde mit 0.01 nM veranschlagt [Lips and Keller, 1999]. Auch ionotrope Rezeptoren sind somit eine Calciumquelle. Dabei sind in Motoneuronen wie bereits erwähnt nicht nur NMDA-Rezeptoren, sondern auch ein Teil der AMPA-Rezeptoren calciumdurchlässig (siehe 1.2.3.2). Weiterhin ist ein großer Anteil an calciuminduzierter Freisetzung von Calcium aus internen Speichern belegt [Jahn et al., 2006]. Die Expression der dafür nötigen Ryanodinrezeptoren (RyR) wurde in Motoneuronen nachgewiesen, genauso wie die von Inositoltrisphosphatrezeptoren (IP₃R) für eine Signalkaskaden-induzierte Calciumfreisetzung aus dem ER [Van Den Bosch et al., 1999]. Calcium aus dem ER kann die intrazelluläre Konzentration um bis zu 900 nM steigern [Ladewig et al., 2003]. Diese Calciumquellen sind essentiell für die Funktion der Neurone. Genauso essentiell sind aber auch die Wege, die zu einer Erholung des Calciumsignals führen.

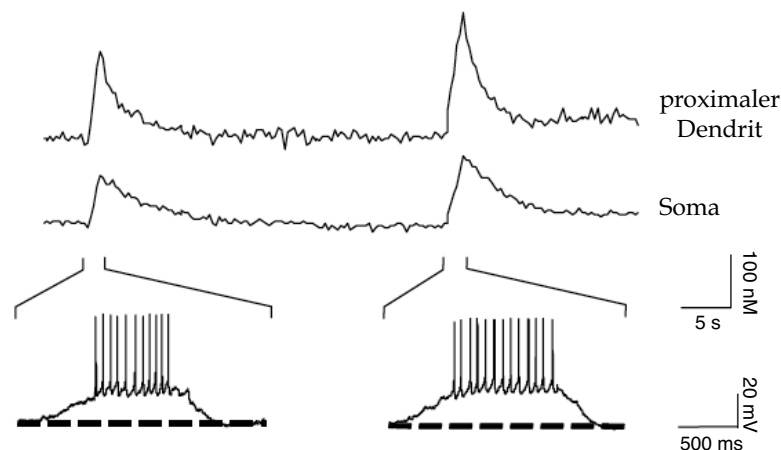


Abbildung 1.10: Intrazelluläre Calciumerhöhung während rhythmischer Aktivität

Eine Generierung von Aktionspotentialen (unten) führt durch die Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration im Soma (Mitte) und den Dendriten (oben). (verändert aus [von Lewinski and Keller, 2005])

1.3.2.2 Calciumtransport in Mitochondrien

Einer dieser Wege ist die Aufnahme und die Speicherung von Calcium in Mitochondrien. Mitochondrien sind ubiquitäre Organellen, die ein hoch dynamisches Netzwerk innerhalb der Zellen bilden und über Transportmechanismen des Zytoskeletts in Neuronen antegrad und retrograd transportiert werden können. Die Mitochondrienmatrix ist mit einer Doppelmembran umgeben, über die hochreguliert Ionen und kleine Moleküle in die Matrix

und das Zytosol gelangen. In die innere Membran sind viele Enzyme eingelagert, die die Hauptaufgabe der Mitochondrien erfüllen, die Bereitstellung von Energie für alle aktiven zellulären Prozesse in Form von ATP. Die dafür ablaufenden enzymatischen Reaktionen sind eine endogene Quelle reaktiver Sauerstoffspezies. Auch an der direkten Einleitung von Apoptose sind Mitochondrien maßgeblich beteiligt durch die Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum in das Zytosol.

Die ATP-Produktion erfolgt am Ende einer Kaskade biochemischer Reaktionen mit der Beteiligung vieler Enzyme, unter anderem der sog. Atmungskette, einer aus vier Enzymkomplexen zusammengesetzten Elektronentransportmaschinerie. Diese Komplexe (Komplex I: NADH-Dehydrogenase, Komplex II: Succinat-Dehydrogenase, Komplex III: Cytochrom c-Reduktase, Komplex IV: Cytochrom c-Oxidase) transportieren Protonen von NADH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) und FADH (Flavin-Adenin-Dinukleotid), die beim Abbau von Glucose in der Mitochondrienmatrix durch Reduktion generiert wurden, in den mitochondrialen Intermembranraum und übertragen die Elektronen auf Sauerstoff. So wird ein Protonengradient aufgebaut, den die ATP-Synthase zur Phosphorylierung von Adenosindiphosphat zu ATP benutzt. Der Protonengradient generiert ein matrixnegatives mitochondriales Membranpotential von etwa 150-180 mV, das die Triebkraft für den Calciumtransport in die Mitochondrienmatrix darstellt. [Kann and Kovacs, 2007]

Die äußere Mitochondrienmembran ist in der Regel gut durchlässig für Calcium. Der unspezifische spannungsgesteuerte Anionenkanal (VDAC) wird als Pore für den Calciumtransport in den Intermembranraum angesehen und stellt selten eine Diffusionsbarriere dar [Gincel et al., 2001]. Regulatorisch wichtiger sind die Calciumtransporter in der inneren Mitochondrienmembran. Mittels Elektrophysiologie, Fluorometrie und spezifischer Pharmakologie wurden Transporter und Kanäle mit verschiedener Kinetik, Calciumsensitivität und Leitfähigkeit postuliert, deren genaue molekulare Identität und Zusammensetzung jedoch meist noch unbekannt ist. [Hoppe, 2010; Malli and Graier, 2010; Santo-Domingo and Demaurex, 2010]

Der mitochondriale Calciumuniporter

Erst im Jahr 2010 wurden zwei der Komponenten des wohl wichtigsten Transportweges für Calcium in die Mitochondrien, des mitochondrialen Calciumuniporters (mCU), identifiziert: MiCU1 (mitochondrialer Calciumuniporter 1) [Perocchi et al., 2010] als Calciumsensor, MCU (mitochondrialer Calciumuniporter) [Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011] als Calciumpore. Pore und Calciumbindestellen wurden schon vorher postuliert [Litsky and Pfeiffer, 1997] und eine Aktivierung durch Calcium-Calmodulin-abhängige Prozesse wurde gezeigt [Moreau et al., 2006]. Auch konnten mit elektrophysiologischen Messungen an isolierten Mitochondrien bereits Eigenschaften des mCU beschrieben werden bevor dessen Identität klar war. So wurde eine hohe Calciumselektivität, eine große Transportkapazität

und eine hohe Expressionsdichte gezeigt. Die einwärtsrektifizierenden Stromeigenschaften (siehe Abb. 1.11a) machen den mCU besonders bei gesunden Mitochondrien mit hyperpolarisiertem Potential effektiv und er kann Calcium in den Mitochondrien theoretisch bis zu 100 mM anreichern (nach Nernst mit einem angenommenen mitochondrialen Membranpotential von -180 mV und einer zytosolischen Calciumkonzentration von 100 nM). Diese Eigenschaften weisen trotz des Namens eher auf einen Kanal als auf einen Transporter hin. Der mCU zeigt nur eine geringe Calciumsensitivität im mikromolaren Bereich und ist so wahrscheinlich verantwortlich für die Calciumaufnahme in Mitochondrien, die in Mikrodomänen um eine Calciumquelle liegen, wo lokal hohe Calciumkonzentrationen auftreten. Unter einer Mikrodomäne versteht man einen Raum von wenigen Mikrometern Durchmesser, der sich innerhalb des Zytosols durch eine deutlich andere Zusammensetzung der Intrazellulärflüssigkeit von der Umgebung unterscheidet. Sie wird durch den lokal spezifischen Kanalbesatz der Zellmembran generiert.

Blockiert werden kann der Uniporter mit dem spezifischen pharmakologischen Hemmstoff Ruthenium 360 (Ru360) mit halbmaximaler Hemmung bei $IC_{50} = 2 \text{ nM}$ [Kirichok et al., 2004; Santo-Domingo and Demaurex, 2010].

Mittels elektrophysiologischer Messungen wurden zwei verschiedene Ströme durch Uniporter beschrieben, ein stark Ru360 empfindlicher mit hoher Einzelkanalleitfähigkeit (13.7 pS) und ein zweiter mit kleinerer Einzelkanalamplitude, kleinerer Leitfähigkeit (7.67 pS) und höherer Offenwahrscheinlichkeit und Dauer. Letzterer war auch weniger sensitiv gegenüber Ru360 [Michels et al., 2009]. Eine molekulare Differenzierung dieser beiden Transportwege ist bisher noch nicht gelungen, evtl. stellen sie verschiedene Konformationen des gleichen Kanals dar. [Hoppe, 2010]

Der mitochondriale Natrium-Calcium-Austauscher

Auch erst 2010 konnte ein Bestandteil eines weiteren Calciumtransporters der inneren Mitochondrienmembran identifiziert werden. Palty und Kollegen konnten zeigen, dass der Natrium-Calcium-Lithium-Austauscher (NCLX) alle Eigenschaften des gut beschriebenen Natrium-Calcium-Austauschers der Mitochondrien (mNCX) aufwies [Palty et al., 2010]. Der mNCX wird als Hauptweg für Calcium aus der Mitochondrienmatrix in das Zytosol angesehen [Carafoli et al., 1974]. Er vermittelt einen elektrogenen Transport von drei Natriumionen gegen ein Calciumion [Jung et al., 1995] und ist blockierbar durch das Benzodiazepinderivat CGP37157 ($IC_{50} = 366 \text{ nM}$ [Cox et al., 1993]). Somit wird Calcium, das in die Mitochondrien gelangt ist, wieder in das Zytosol abgegeben. Dieser Zyklus verhindert eine Überladung der Mitochondrien mit Calcium, was eine Hemmung der Elektronentransportkette oder schlimmstenfalls eine Apoptoseinduktion durch die Öffnung der Permeabilitätstransitions-pore auslösen könnte (siehe unten). Mit diesem Mechanismus werden aber auch lokale Calciumkonzentrationen und calciumabhängige Signalwege und die Aktivität

der Mitochondrien intrazellulär regelbar [Thayer and Miller, 1990; Friel and Tsien, 1994]. Auch steht so Calcium zu Verfügung, um das ER nach einer Entleerung wieder zu beladen [Arnaudeau, 2001]. (Für einen Übersichtsartikel siehe [Castaldo et al., 2009])

Es gibt auch Hinweise dafür, dass der mNCX Calcium in die Mitochondrien transportieren kann. So wurde gezeigt, dass bei stark depolarisiertem mitochondrialem Membranpotential, wie es bei pathologischen Zuständen wie ALS vorkommt [Carrì et al., 1997; Jaiswal and Keller, 2009; Coussee et al., 2011], und Blockade aller anderen Calciumimport-Prozesse die mitochondriale Calciumkonzentration natriumabhängig steigt [Kim and Matsuoka, 2008]. Berechnet wurde aber auch eine Umkehr der Transportrichtung bei hyperpolarisiertem Mitochondrienpotential von -170 mV, wenn die zytosolische Natriumkonzentration über 36 mM steigt [Chinopoulos and Adam-Vizi, 2010]. Der Transporter kann somit je nach Umgebung Calcium in die Mitochondrien oder aus diesen heraus transportieren (siehe Abb. 1.11b).

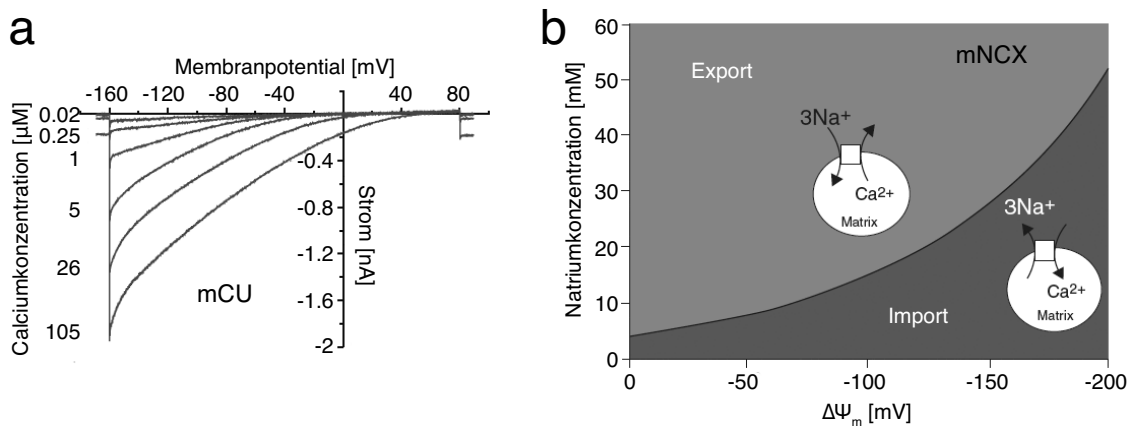


Abbildung 1.11: Eigenschaften mitochondrialer Calciumtransporter

(a) Strom-Spannungskurve für den mitochondrialen Calciumuniporter. Der mCU zeigt einwärtsrektilisierende Eigenschaften und eine geringe Affinität für zytoplasmatisches Calcium. (verändert aus [Kirichok et al., 2004]) (b) Modell der Transportrichtung des mitochondrialen Natrium-Calcium-Austauschers. Der mNCX kann sowohl Calcium aus den Mitochondrien heraus als auch in diese hinein transportieren, je nach mitochondrialem Membranpotential und zytoplasmatischer Natriumkonzentration. (verändert aus [Chinopoulos and Adam-Vizi, 2010])

Weitere Calciumtransportmechanismen

Neben diesen zwei wichtigsten Calciumtransportmechanismen wurden weitere Transporter bzw. Transportarten beschrieben. 2009 wurde das Gen *Letm1* (*leucin-zipper EF-hand transmembranprotein 1*) identifiziert, dessen Produkt die Funktion des postulierten mitochondrialen Calcium-Protonen-Antiporters erfüllt. Dieser Transport hat eine hohe Affinität für Calcium, arbeitet nur bei einer zytosolischen Calciumkonzentration unter $1 \mu\text{M}$ und ist so wahrscheinlich in Mitochondrien wichtig, die nicht in Mikrodomänen von Calciumquellen lokalisiert sind [Jiang et al., 2009]. Bisher wurde kein spezifischer Blocker dieses Transport-

weges beschrieben, Ruthenium Red blockiert alle Calciumtransporter der Mitochondrien [Santo-Domingo and Demaurex, 2010].

Auch Ryanodinrezeptoren sind potentielle Calcium-Aufnahmewege. Die Existenz in der inneren Mitochondrienmembran ist jedoch fraglich. Beutner und Kollegen postulierten diesen hoch effizienten Aufnahmeweg in Herzmuskelzellen [Beutner et al., 2001] und Ryu und Kollegen beschrieben dessen Eigenschaften [Ryu et al., 2011]. Ein histologischer Nachweis gelang aber nicht [Salnikov et al., 2009]. Ebenso wenig definiert ist der sogenannte schnelle Aufnahmemodus (*rapid uptake mode*, RaM), über den bei niedrigen Calciumkonzentrationen im Nanomolbereich schnell große Mengen des Ions in Mitochondrien gelangen sollen, bevor der Uniporter die Aufgabe übernimmt [Sparagna et al., 1995; Buntinas et al., 2001]. Eine molekulare Identifizierung fehlt auch hier, evtl. stellt der RaM eine Konformationsvariante des mCU dar [Gunter and Sheu, 2009].

Eher modulatorische Wirkung haben die Proteine UCP2 und UCP3 (*uncoupling protein 2/3*). So wurde gezeigt, dass diese Proteine essentiell für die Calciumaufnahme in die Mitochondrien sind [Trenker et al., 2007] und je nach Expressionsniveau die Mitochondrien sensitivieren für die Aufnahme von Calcium aus internen Speichern oder externen Quellen [Waldeck-Weiermair et al., 2010a,b]. Die Wirkung ist unabhängig von Letm1 und MiCU1 [Waldeck-Weiermair et al., 2011], der genaue Mechanismus ist Gegenstand aktueller Forschung.

Die mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore

Über die beschriebenen Mechanismen ist es Mitochondrien möglich, bei zellulärer Aktivität bis zu einem Mol Calcium anzureichern, wobei der Großteil mit Phosphat, Carbonat (Hydroxylapatit) und Proteinen komplexiert vorliegt, die Konzentration an freiem Calcium liegt im mikromolaren Bereich. In Ruhe sind etwa $100\text{ }\mu\text{M}$ Calcium in Mitochondrien gespeichert, 100 nM davon frei [Chalmers and Nicholls, 2003]. Eine Depolarisation von Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus von -60 mV auf $+30\text{ mV}$ über zwei Sekunden erhöhte die freie mitochondriale Calciumkonzentration um etwa 800 nM [Ladewig et al., 2003].

Die Mitochondrien sind somit gute Calciumspeicher, freies Calcium in Mitochondrien hat aber auch Signalwirkung. So sind viele Enzyme, die direkt oder indirekt zur ATP-Generierung beitragen durch Calcium in ihrer Aktivität beeinflusst. Unter anderem wird die ATP-Synthase selbst durch Calcium aktiviert, was zu gesteigerter ATP-Bildung bei Calciumaufnahme führt [Das and Harris, 1990]. (Für einen Übersichtsartikel siehe [McCormack et al., 1990])

Negative Effekte mitochondrialen Calciums sind die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials durch Calciuminflux [Kovacs, 2005] und bei extremer Calciumüberladung die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mPTP).

Die mPTP ist ein Proteinkomplex noch weitestgehend unbekannter Zusammensetzung, der

sich durch beide Mitochondrienmembranen zieht. Einige Bestandteile wurden identifiziert, wie VDAC [Baines et al., 2007] oder Cyclophilin D [Baines et al., 2005]. Letzteres ist der Angriffspunkt von Cyclosporin A, das die Öffnung der mPTP hemmt [Nicolli et al., 1996]. Generell wird davon ausgegangen, dass die mPTP öffnet, wenn die mitochondriale Calciumkonzentration zu stark ansteigt, um eine Calciumüberladung der Mitochondrien zu verhindern [Chalmers and Nicholls, 2003]. Andererseits wird vermutet, dass die mPTP entsteht, wenn sich bei zellulären Schädigungen viele fehlgefaltete Proteine der inneren Mitochondrienmembran zusammenlagern und eine Pore bilden [He and Lemasters, 2002]. Die mPTP ist permeabel für Moleküle bis zu 1.5 kDa, also nicht nur für Calcium sondern auch für proapoptotische Stoffe wie Cytochrom c. Es kommt neben der Calcium- und Cytochrom c-Freisetzung zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und einer Schwellung der Mitochondrien und schließlich zur Apoptoseinduktion. [Bernardi et al., 2006; Azarashvili et al., 2010; Starkov, 2010]

Diese Vorgänge werden verantwortlich gemacht für nekrotisches und apoptotisches Zellsterben bei Ischämie nach Herzinfarkt aber auch für neurodegenerative Krankheiten von Alzheimer bis ALS. Die mPTP-Öffnung muss aber nicht zwangsläufig zum Zelltod führen. Sie ist reversibel [Ichas and Mazat, 1998]. Eine physiologische Funktion wie die schnelle Freisetzung von Calcium in das Zytoplasma durch eine transient geöffnete mPTP ist daher wahrscheinlich [Bernardi and Petronilli, 1996].

1.3.2.3 Das Endoplasmatische Retikulum als Calciumspeicher

Deutlich etablierter als intrazellulärer Calciumspeicher ist das Endoplasmatische Retikulum, zuerst mit einer essentiellen Funktion bei der Muskelkontraktion beschrieben, später auch in Neuronen entdeckt [Henkart, 1980]. Das ER besteht aus großen dynamischen Membrannetzwerken. Das raue ER bindet Ribosomen und stellt den Raum für Proteinsynthese und Faltung. Dem glatten ER wird eine Calciumspeicherfunktion zugeschrieben. Calcium wird über einen ATP-verbrauchenden aktiven Prozess mit der Sarko-Endoplasmatisches Retikulum-Calcium-ATPase (SERCA) in das ER aufgenommen. Über IP_3 -Rezeptoren nach intrazellulärer Signalkaskade oder über Ryanodin-Rezeptoren kann Calcium wieder in das Zytosol gelangen und zu weiteren Signalkaskaden und Aktivitätsregulation vieler Kanäle und Enzyme beitragen. [Verkhratsky, 2005]

Die SERCA zusammen mit modulatorischen Proteinen wie dem Calciumsensor Calreticulin vermittelt die Aufnahme von Calcium in das ER, sobald die ER-Calciumkonzentration absinkt [John et al., 1998]. Von den drei Proteinen der Familie ist in Neuronen nur die SERCA2 in der Transkriptionsvariante 2b exprimiert [Baba-Aissa et al., 1996]. Blockierbar ist die SERCA mit nanomolaren Konzentrationen von Thapsigargin [Lytton et al., 1991]. Eine Folge der Blockade ist eine langsame, irreversible Calciumfreisetzung aus dem ER, da die SERCA den einzigen Aufnahmeweg darstellt.

Abgegeben wird Calcium aus dem ER unter anderem durch Ryanodin-Rezeptoren (RyR). Diese Proteinfamilie bildet tetramere, calciumpermeable Kanäle und besteht aus drei Subtypen, wobei RyR1 hauptsächlich in Skelettmuskelzellen und RyR2 in Herzmuskelzellen exprimiert wird. RyR3 wurde ursprünglich als einzige neuronale Variante angesehen, in Neuronen findet man aber alle drei Subtypen [Giannini et al., 1995]. Im Gegensatz zu RyR1 im Skelettmuskel, der ohne Calcium direkt mechanisch gekoppelt bei einer Konformationsänderung von L-Typ Calciumkanälen der Plasmamembran geöffnet wird, vermitteln RyR2 und RyR3 eine calciuminduzierte Calciumfreisetzung mit hoher Leitfähigkeit [Kano et al., 1995], die aber bei zu hoher zytoplasmatischer Calciumkonzentration auch wieder gehemmt wird [Fill et al., 1990]. (Für einen Übersichtsartikel siehe [Henzi and MacDermott, 1992])

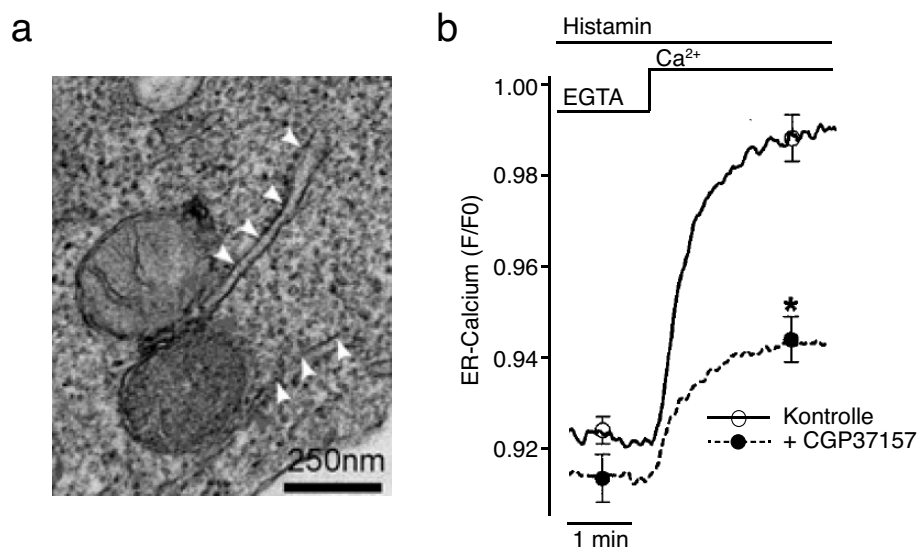


Abbildung 1.12: ER-Mitochondrien Calciumzyklus

Das intrazelluläre Speichern von Calcium erfolgt in einem Wechselspiel zwischen ER und Mitochondrien. (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme Zellkultur. ER (weiße Pfeilspitzen) und Mitochondrien stehen in räumlich engem Kontakt. (verändert aus [Csordás et al., 2010]) (b) Fluorometrische Messungen der ER-Calciumkonzentration. Wird die zytoplasmatische Calciumkonzentration erhöht, steigt die Konzentration von Calcium auch im ER, jedoch nur maximal, wenn die Calciumabgabe aus Mitochondrien nicht durch CGP37157 gehemmt wird. Histamin führt zur IP₃-Bereitstellung, was für diesen Effekt essentiell ist. (verändert aus [Malli et al., 2005])

IP₃ entsteht nach einer Aktivierung von Gq gekoppelten Rezeptoren der Plasmamembran durch verschiedenste Neurotransmitter oder der Aktivierung von Tyrosinkinasen durch Wachstumsfaktoren. Der IP₃-Rezeptor bindet diesen Signalstoff und öffnet eine Kanalpore. Es wurden drei IP₃-Rezeptor-Subtypen identifiziert, die unterschiedliche Gewebeverteilung und IP₃-Affinität aufweisen [Wojcikiewicz, 1995]. Caffein öffnet diese Kanäle und wird experimentell eingesetzt für eine komplette schnelle Calciumentleerung des ER [Wakui et al., 1990]. Besonderes Augenmerk der Forschung liegt auf einem Calciumzyklus zwischen ER

und Mitochondrien. Es konnte gezeigt werden, dass Calcium aus dem ER lokale Mikrodomänen generiert, die den niedrig affinen Calciumtransport in die Mitochondrien stimuliert [Rizzuto et al., 1993]. Diese Kopplung wird durch die enge zelluläre Nähe der zwei Organellen gestützt (siehe Abb. 1.12a) [Csordás et al., 2010]. Es gibt aber auch Hinweise, dass dieser Calciumaustausch zu einer Wiederauffüllung des ER durch mitochondriales Calcium führen kann. Unter Anwesenheit von IP_3 erhöht sich die Calciumkonzentration im ER von Endothelzellen nur, wenn die Mitochondrien ein stark hyperpolarisiertes Membranpotential aufweisen und der mNCX funktionstüchtig ist, Calcium also aus den Mitochondrien in das Zytosol gelangen kann (siehe Abb. 1.12b) [Malli et al., 2005]. Dieser dynamische Calciumaustausch zwischen Mitochondrien und ER ermöglicht eine höhere Kapazität intrazellulärer Speicher und die Möglichkeit ohne extrazelluläre Einflüsse Calcium als intrazelluläres Signalmolekül bereitzustellen. [Rizzuto et al., 2009]

1.3.2.4 Calciumextrusion über die Plasmamembran

Der dritte und finale Weg für eine Erholung des Calciumsignals ist die Möglichkeit Calcium komplett aus der Zelle in den Extrazellularraum zu transportieren. Dazu werden in der Plasmamembran zwei Arten von Transportern exprimiert, eine Calcium-ATPase (Plasmamembran Calcium-ATPase, PMCA) und ein Natrium-Calcium-Austauscher (NCX). Die PMCA transportiert unter Verbrauch von ATP im Verhältnis von 1:1 Calcium aus der Zelle hinaus. Im Gegensatz zu den mitochondrialen Transportern sind hier die Proteine bekannt und es gibt neben den vier Hauptgenen viele Transkriptionsvarianten mit unterschiedlicher Gewebeverteilung und Kinetik [Strehler et al., 2007]. Moduliert wird die Funktion und die Calciumaffinität der PMCA unter anderem durch Phosphorylierungen [James et al., 1989], aber auch durch Calcium-Calmodulin [Enyedi et al., 1987], wobei die Gen- und Transkriptionsvarianten sich in der Affinität zu Calcium-Calmodulin unterscheiden. Die Calciumextrusion ist somit calciumabhängig, was zu einer niedrigen Calciumaffinität in Ruhe und zu einer Haupttransportaktivität bei hoher intrazellulärer Calciumkonzentration führt [Enyedi et al., 1987]. Eine Hemmung von PMCA2 ist mit einer Calciumüberladung der Zellen verbunden, eine Deletion mit einem frühen Absterben von Motoneuronen des Spinalmarks und Störungen der internen Homöostase in Purkinjezellen [Kurnellas et al., 2005]. Einen Hinweis für eine Dysregulation bei ALS gibt es bisher nicht.

Auch bei dem NCX gibt es verschiedene Gene (NCX1-3) und Varianten mit unterschiedlicher Gewebeverteilung [Quednau et al., 1997]. Diese Proteine transportieren ein Calciumion im Austausch mit drei Natriumionen, die Richtung des Transports ist aber variabel je nach elektrochemischer Triebkraft. Bei hoher neuronaler Aktivität und viel Calciuminflux wird der Transporter eher Calcium aus der Zelle transportieren. In Ruhe ist die intrazelluläre Calciumkonzentration zu gering, um einen Export zu ermöglichen, da die Calciumaffinität sehr niedrig ist. Ein Export wäre denkbar bei Energiemangel mit folgender Inhibition

der Natrium-Kalium-ATPase und damit einer hohen intrazellulären Natriumkonzentration. [Blaustein and Lederer, 1999]

Aufgrund der Transportmöglichkeit in beide Richtungen wurde spekuliert, ob der NCX bei Zellschädigungen neuroprotektiv wirkt oder ob er durch den Transport von Calcium in ein vorgeschädigtes Neuron eher toxische Wirkung hat. In einem Ischämiemodell wurde bei NCX3-defizienten Mäusen eine verstärkte Neurodegeneration festgestellt [Jeffs et al., 2008], auch NCX2 zeigte deutlich neuroprotektive Eigenschaften durch den Export von Calcium [Jeon et al., 2008]. Auch bei Exzitotoxizität scheint der NCX neuroprotektiv zu wirken [Andreeva et al., 1991]. Ein Einfluss des NCX bei ALS wurde bisher nicht beschrieben.

1.3.2.5 Calciumhomöostase in Motoneuronen bei ALS

Wie bereits mehrfach aufgeführt, sind die Calciumüberladung der Motoneurone und eine mitochondriale Schädigung die meist diskutierten Degenerationsmechanismen, sowohl für sporadische als auch für familiäre ALS-Formen. Genaue Mechanismen und Studien, die Veränderungen der soeben beschriebenen einzelnen Calciumregulierungsmechanismen in Motoneuronen aufdecken, sind selten und weitestgehend aus Zellkulturanalysen oder an früh postnatalen Mäusen durchgeführt. Erste Hinweise für physiologische Veränderungen lieferten Carri und Kollegen, die mit fluorometrischen Messungen bei mit mutierter SOD1 transfizierten Neuroblastomzellen ein depolarisiertes mitochondriales Membranpotential und somit eine verringerte Triebkraft zur Calciumaufnahme zeigen konnten [Carrì et al., 1997]. Dies wurde von Cousse und Kollegen bestätigt und ergänzend eine verringerte mitochondriale Calciumaufnahmekapazität nach Calciumfreisetzung aus dem ER beschrieben. Eine Verringerung dieses Effekts konnte durch die Blockade des mNCX erreicht werden, was darauf hindeutet, dass dieser Export von Calcium aus den Mitochondrien in dem verwendeten Modell stark aktiv ist [Cousse et al., 2011]. An embryonalen Motoneuronkulturen des SOD1-G93A Mausmodells wurde eine geringere mitochondriale Calciumkonzentration gezeigt [Jaiswal et al., 2009], sowie eine stärkere Erhöhung des zytosolischen Calciums bei Stimulation der Zellen mit Glutamat [Kruman et al., 1999]. Bei Messungen von Mitochondrien der neuromuskulären Endplatte in SOD1-G93A Mäusen wurde durch elektrische Stimulation eine sehr große Steigerung der Calciumkonzentration in Mitochondrien beobachtet, woraufhin vermutet wurde, dass die Calciumkomplexierung weniger gut funktioniert [Vila et al., 2003]. Trotz geringerer Triebkraft für eine Calciumaufnahme depolarisieren die Mitochondrien bei der Calciumbeladung deutlich stärker im ALS-Modell [Nguyen et al., 2009]. An isolierten Mitochondrien aus dem SOD1-Mausmodell konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass eine Öffnung der mPTP in den kranken Tieren schon bei einer geringeren Calciumbelastung erfolgt als bei Wildtyptieren (siehe Abb. 1.13a) [Damiano et al., 2006]. Die Auswertung von fluorometrischen Messungen hypoglossaler Motoneurone aus SOD1-G93A Mäusen im Alter von P2-P4 zeigte keinen Unterschied in der Calciumpuf-

ferkapazität oder den Erholungskinetiken des Calciumsignals [von Lewinski et al., 2008]. Allerdings fand dieselbe Arbeitsgruppe in 14-15 Wochen alten Mäusen in der gleichen Präparation ein verringertes mitochondriales Membranpotential (siehe Abb. 1.13b) und eine geringere Konzentration von Calcium in den Mitochondrien [Jaiswal and Keller, 2009]. Diese beschreibenden Studien lassen mechanistische Erklärungen vermissen. Eine vor kurzem veröffentlichte Arbeit, welche die Bindung von mutierter SOD1 an VDAC nachweist, zeigt, dass die Permeabilität dieser Calciumpore der äußeren Mitochondrienmembran eingeschränkt wird. Die Arbeitsgruppe konnte aber keinen Hinweis auf eine Veränderung der Calciumaufnahme finden [Israelson et al., 2010]. Weitere detaillierte Studien zur veränderten Calciumhomöostase bei ALS und eine Abklärung des Degenerationsmechanismus im Endstadium müssen folgen.

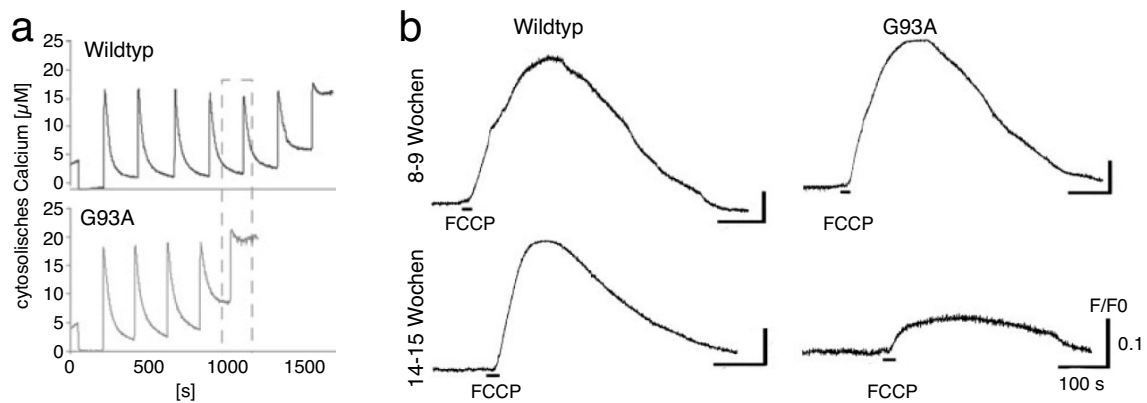


Abbildung 1.13: Mitochondriale Schädigung bei ALS

Mitochondriales Membranpotential und Calciumaufnahme ist pathologisch verändert in ALS-Modellen (a) Fluorometrische Messung der Calciumkonzentration in Mitochondrien adulter SOD1-G93A Motoneuron-terminalen bei Stimulation. Im ALS-Modell kommt es zu einer frühen Überladung der Mitochondrien mit Öffnung der mPTP. (verändert aus [Damiano et al., 2006]) (b) Fluorometrische Messungen des mitochondrialen Membranpotentials (Rhodamine123). Mitochondrien aus adulten SOD1-G93A Mäusen (Alter um P100) haben ein depolarisiertes Membranpotential. Die Fluoreszenz ändert sich kaum bei mitochondrialer Entkopplung mit FCCP (Carbonylcyanid-P-Trifluoromethoxyphenylhydrazon). (verändert aus [Jaiswal and Keller, 2009])

1.4 Ziel der Arbeit

Die ALS manifestiert sich wie die meisten neurodegenerativen Krankheiten in der Regel erst in fortgeschrittenem Alter. Auch im Mausmodell entwickeln sich die Symptome erst spät. Eine Analyse der Motoneuroneigenschaften kurz nach Geburt gibt daher nur Hinweise auf Veränderungen, die durch die genetische Manipulation von Beginn an bestehen. Trotzdem entwickeln sich die Tiere weiter und die Neurone überleben viele Wochen. Welche Mechanismen schließlich zur Degeneration führen, lässt sich nur untersuchen, wenn die Analysen auch an Motoneuronen adulter Tiere und Tieren im Endstadium der Krankheit vorgenommen werden. Aufgrund technischer Probleme war es bisher allerdings nicht möglich adulte Motoneurone passenden Alters (um P130) elektrophysiologisch zu untersuchen. Auch Daten über die Calciumhomöostase in adulten Motoneuronen sind rar.

Im Zuge meiner Diplomarbeit ist es gelungen, diese technischen Probleme zu lösen und eine Präparation von Hirnstammotoneuronen zu etablieren, die nun eine *in vitro*-Einzelzellanalyse mittels der *Patch-Clamp*-Technik in Mäusen jeden Alters erlaubte. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methodik optimiert und für fluorometrische Messungen erweitert. Somit war es möglich die elektrophysiologischen Eigenschaften sowie die Calciumhomöostase bei adulten Motoneuronen zu untersuchen. Es sollten adulte MN von Wildtypmäusen mit denen aus einem ALS-Mausmodell im Endstadium verglichen werden, um durch das Aufzeigen eventueller Unterschiede Pathomechanismen direkt aufzuklären und Therapiemöglichkeiten vorzuschlagen, die bei bereits geschädigten Neuronen greifen könnten. Außerdem sollten zur Erklärung der differentiellen Vulnerabilität von Motoneuron-Subpopulationen die Analysen sowohl bei den vulnerablen MN des Ncl. Hypoglossus, als auch bei den resistenten MN des Ncl. Oculomotorius durchgeführt werden.

Material und Methoden

Die Herkunft der im Folgenden erwähnten Chemikalien wird unter 2.8, die Zusammensetzung der Lösungen unter 2.7 aufgeführt.

2.1 Mausmodell

Für alle Messungen wurden männliche Mäuse des Stamms B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur (im Folgenden als G93A bezeichnet) oder männliche Wildtypkontrollen des gleichen genetischen Hintergrundes (im Folgenden wt abgekürzt) verwendet. Die ersten Zuchtpaare wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) bezogen und mit diesen in Frankfurt eine Zuchtkolonie etabliert und die Nachkommen der Zucht weiter verpaart. Dazu mussten männliche G93A-Tiere mit weiblichen Wildtyptieren verpaart werden, da weibliche G93A-Tiere unfruchtbar sind. Die Tiere wurden in Gruppen von einem bis drei Tieren in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus, einer Temperatur von 21 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 45-65% mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Alle Tierversuche wurden nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Versuche waren beim Regierungspräsidium Darmstadt angezeigt (Anzeigennummer V54-19c20/15-F28/02 und F28/04). Kranke Tiere bekamen in Wasser eingeweichtes Futter auf den Käfigboden. G93A-Tiere, die nicht für die Versuche gebraucht wurden, wurden vor Erreichen des Endstadiums durch zervikale Dislokation getötet.

2.1.1 Definition des Krankheitsendstadiums

Für alle Versuche wurden G93A-Tiere im Endstadium der Krankheit verwendet (siehe 1.2.6.2). Dieses Stadium konnte nicht alleine anhand des Alters der Mäuse festgelegt werden, da das Fortschreiten der Symptome von Maus zu Maus unterschiedlich war. Gründe hierfür waren ein möglicher Kopienverlust des Transgens (Kopienzahl bedingt proportional die Schwere und Schnelligkeit des Krankheitsfortschritts) [Alexander et al., 2004; Henriques et al., 2010] und eine Variabilität der Symptomentwicklung je nach Konstitution (Geschlecht, Gewicht, Einzel- oder Gruppenhaltung) [eigene Beobachtungen] und genetischem Hintergrund der einzelnen Maus [Heiman-Patterson et al., 2005]. Es wurde deshalb eine Abschätzung des Endstadiums über den Lähmungsstatus der Beine vorgenommen. Mäuse, die im Gangmuster keine differentielle Benutzung der beiden Hinterläufe zeigten und sich nicht mehr mit dem Rücken nach unten an einem Gitter halten konnten (*paw*

grip endurance test) wurden ab P115 als im Endstadium definiert und für die Experimente herangezogen. Dieses Kriterium entsprach Stadium CS4 (*clinical score 4*) nach Solomon und Kollegen [Solomon et al., 2011]. Wenn G93A-Mäuse älter als P140 waren und nicht den gewünschten Symptomstatus hatten, wurden sie nicht mehr für Versuche verwendet, um die Variabilität einzuschränken. Als Wildtypkontrollen wurden Mäuse zwischen P115 und P140 verwendet.

2.1.2 Genotypisierung

Die Nachkommen der Zucht wurden an P20 vom Muttertier abgesetzt und mittels Ohrlochern markiert. Für die Bestimmung des Genotyps wurde das Gewebe aus den Ohrstanzen in autoklavierten Reaktionsgefäßen aufbewahrt. Nach der DNA-Gewinnung aus den Proben konnte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) mit genspezifischen *Primern* auf das Vorhandensein des Transgens getestet werden.

Dazu wurde die Gewebeprobe der zu genotypisierenden Maus über Nacht bei 55 °C in 500 µl Lysispuffer inkubiert. Die nicht-lysierten Bestandteile konnten mittels Zentrifugation (10 min, 13000 Umdrehungen/min) abgetrennt und der Überstand mit gelöster DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Durch die Zugabe der gleichen Volumenmenge 100% Isopropanol zum Überstand fiel die DNA aus, wurde abzentrifugiert (5 min, 13000 Umdrehungen/min) und konnte nach dem Abnehmen der Flüssigkeit 30 min bei Raumtemperatur im offenen Reaktionsgefäß getrocknet werden. Anschließend wurde die DNA in 50 µl 10 mM Tris aufgenommen, eine Stunde bei 55 °C gelöst und bis zur Weiterverwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Die PCR, eine Standardmethode zur Amplifikation kleiner DNA-Mengen bis zur Nachweisbarkeit, wurde nach den Vorgaben zur Genotypisierung des verwendeten Mausstammes von Jackson Laboratories [JacksonLaboratories, 2011] durchgeführt. Es wurden spezifische *Primer* für die endogene Wildtyp-SOD1 und für die humane mutierte Form verwendet. Der PCR-Ansatz ist in Tabelle 2.1, die PCR-Bedingungen in Tabelle 2.2 aufgeführt. Für die Generierung der Temperaturzyklen wurde das Gerät TGradient (Biometra, Göttingen) verwendet.

Sequenzen der verwendeten spezifischen *Primer* für die PCR:

SOD1-Wildtyp *forward*: 5'- CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT -3'

SOD1-Wildtyp *reverse*: 5'- GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C -3'

SOD1-G93A *forward*: 5'- CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA -3'

SOD1-G93A *reverse*: 5'- CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA -3'

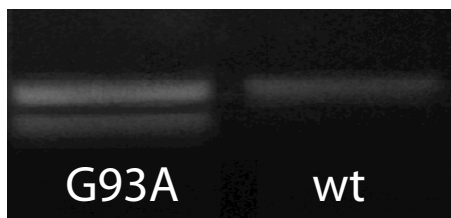
Original-DNA	1 μ l
10x PCR-Puffer	3 μ l
dNTPs 5 mM	1 μ l
<i>Primer</i> 20 μ M	je 0.2 μ l
RedTaq 1 Einheit/ μ l	1.5 μ l
steriles Wasser	22.7 μ l

Tabelle 2.1: PCR-Ansatz

Temperatur	Dauer	Zykluszahl
95 °C	3 min	1x
95 °C	30 s	35x
60 °C	45 s	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	1x
4 °C	∞	

Tabelle 2.2: PCR-Bedingungen

Das PCR-Produkt wurde anschließend auf ein 1.5% Agarosegel in Tris-Acetat-Ethylen-diamintetraessigsäure-Puffer (TAE) aufgetragen und die negativ geladene DNA nach ihrer Länge in einem Gleichstromfeld (Power Pack P25, Biometra, Göttingen) aufgetrennt. Im Gel war SybrSafe (0.1 μ l/ml) enthalten, das sich in die DNA einlagerte und nach der Auftrennung die Visualisierung der DNA-Banden unter ultraviolettem Licht (TI2, Biometra, Göttingen) ermöglichte. Die DNA eines Wildtyp-Tieres zeigte nach der PCR nur eine Bande im Gel, die eines G93A-Tieres zwei. Die Bande, die weiter entfernt von der Auftragungstasche war, entsprach der G93A Bande, da das Produkt zwischen den humanen G93A *Primern* mit 236 Basenpaaren kürzer war als das zwischen den murinen Wildtyp-*Primern* mit 324 Basenpaaren und damit schneller durch das Gel wanderte (siehe Abb. 2.1).

**Abbildung 2.1:** Gelbild einer Genotypisierung

Das Produkt einer Genotypisierungs-PCR aufgetragen auf einem Agarosegel und nach Auftrennung visualisiert unter UV-Licht. Die DNA aus G93A-Mäusen zeigte zwei Banden der endogenen und der transgenen SOD1, die wt DNA nur die endogene Bande.

2.2 Präparation adulter Hirnschnitte

Die elektrophysiologischen und fluorometrischen Messungen für diese Arbeit wurden erstmals an Motoneuronen in Hirnschnitten adulter Mäuse durchgeführt. Eine Anpassung der Präparation an die veränderten Ansprüche adulter Zellen war daher essentiell für eine erfolgreiche Studie. In adultem Hirngewebe befand sich mehr Myelin als in postnatalem, was die Visualisierung erschwerte, aber auch den Zugang von Sauerstoff zu den Zellen im Schnitt verringerte. Die Motoneurone waren viel empfindlicher gegenüber mechanischem und exzitotoxischem Stress sowie Sauerstoffmangel [Mitra and Brownstone, 2011]. Eine ungenügende Präparation führte generell zu schwierigerem Auffinden der Zellen, weniger lebenden Zellen im Schnitt und zu einer Vulnerabilität der noch vorhandenen Zellen, die

eine *Gigaseal*-Bildung (siehe 2.3.3) erschwerte oder unmöglich machte. Im Folgenden soll deshalb das Vorgehen bei der Präparation genau erläutert und auf kritische Schritte hingewiesen werden.

G93A-Mäuse im richtigen Krankheitsstadium oder Wildtypmäuse passenden Alters wurden durch intraperitoneale Injektion eines Gemischs aus 250 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 2.5 mg/kg Körpergewicht Medetomidinhydrochlorid (Domitor) narkotisiert. Die Dosierung war letal, es musste aber Herzschlag und Atmung noch bis zur Perfusion vorhanden sein, weswegen eine Anpassung an das Gewicht und den Gesundheitsstatus der Mäuse notwendig war. Nach Erlöschen aller Abwehrreflexe in tiefer chirurgischer Narkose wurde die Maus mit dem Rücken nach unten auf einer Styroporunterlage fixiert. Zuerst wurde Fell und Haut über dem Thorax mit einem Hautschnitt an der Mittellinie und je einem nach lateral verlaufenden Schnitt unterhalb des Xiphoids und leichtem Ziehen der Haut zu den Seiten entfernt. Mit einer stumpfen Pinzette konnte man nun das Xiphoid leicht anheben und mit einer Schere das Zwerchfell perforieren, so dass die Lunge kollabierte. Sobald der Thorax so eröffnet war, musste zügig vorgegangen werden, da das Gewebe keinen frischen Sauerstoff mehr erhielt. Die Rippen wurden jetzt mit je einem seitlichen Schnitt durchtrennt, nach rostral geklappt und mit einer Klemme fixiert. Das Herz war somit freigelegt und wurde noch von umgebendem Bindegewebe befreit. Außerdem wurde die Bauchaorta auf Höhe des Zwerchfells abgeklemmt. Zur Vermeidung der Blutgerinnung in den Hirngefäßen injizierte man anschließend 50 μ l Heparin (250 Einheiten) in den linken Ventrikel des noch schlagenden Herzens.

Nun wurde die Maus mittels einer Zweigegepumpe (Ismatec, Glattbrugg, Schweiz), einem angeschlossenen Schlauchsystem (Polyethylen- und Silikonschläuche) und einer stumpfen 21 Gauge Kanüle ebenfalls linksventrikulär für 2-3 Minuten mit etwa 15 ml/min Flussgeschwindigkeit mit modifizierter artifizierter Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF, Zusammensetzung siehe 2.7) perfundiert. Die Perfusionslösung war zuvor in einem 500 ml Becherglas für eine Stunde bei -80°C soweit gefroren, dass sich um einen Flüssigkeitskern eine Eisschicht gebildet hatte und die Lösung etwa 4°C kalt war. Das Gehirn konnte dadurch schon bei der Perfusion gekühlt werden. Dies diente ebenso der Verringerung der exzitotoxischen Schädigung während der Präparation, wie die in der Lösung vorhandene hohe Magnesiumkonzentration und Kynurensäure, ein unspezifischer pharmakologischer Antagonist ionotroper Glutamatrezeptoren. Blut und Perfusionsflüssigkeit konnten über den eröffneten rechten Herzvorhof abfließen.

Nach Beendigung der Perfusion wurde die Maus unter Erhalt von ca. 0.5 cm Wirbelsäule dekapitiert. Beim Herauspräparieren des Gehirns aus dem Schädel war es essentiell, dass die Nerven der zu untersuchenden Kerne nicht mechanisch gereizt sondern sauber abgeschnitten wurden. Um dies zu gewährleisten schnitt man nach dem Entfernen des Fells auf der Schädelkalotte mit einer feinen Federschere dorsal durch die Wirbelkörper und die sa-

gittale Suture entlang bis Bregma. Nun konnte man mit einer Pinzette die Wirbelkörper und Schädelknochen nach lateral abtragen und das Gehirn mit einer Rasierklinge caudal von Bregma coronal bis zur Schädelbasis durchschneiden. Beim vorsichtigen Herausklappen des Hirns nach caudal waren so nach und nach alle Nerven sichtbar, die mit der Federschere hirnnahe durchtrennt wurden ohne an ihnen zu ziehen. Das Gehirn wurde dann kurz in der kalten Perfusionslösung gelagert und nochmals durch einen coronalen Schnitt am Übergang von Kortex zu Zerebellum (etwa Bregma -5, siehe Abb. 2.2a (2)) zurechtgeschnitten. Für die Schnitte des Ncl. Hypoglossus wurde der caudale Hirnteil auf die rostrale Schnittebene mit Sekundenkleber auf einen Probenhalter aufgeklebt, für die Schnitte des Ncl. Oculomotorius der rostrale Teil auf die rostrale Schnittebene. Die Schnitte wurden in der kalten Perfusionslösung mit einem Vibratom (VT1200S, Leica, Wetzlar) und speziellen Vibratom-Klingen hergestellt. Das verwendete Vibratommodell erlaubte durch die manuelle Minimierung der vertikalen Vibration eine um ein Vielfaches verbesserte Schnittqualität im Vergleich zu den Vorgängermodellen und war somit ein essentieller Faktor für die erfolgreichen Messungen. Die Schnittstärke betrug $250\text{ }\mu\text{m}$, die Schneidgeschwindigkeit 0.08 mm/s , der horizontale Vibrationsausschlag 0.9 mm und die Vibrationsfrequenz 85 Hz .

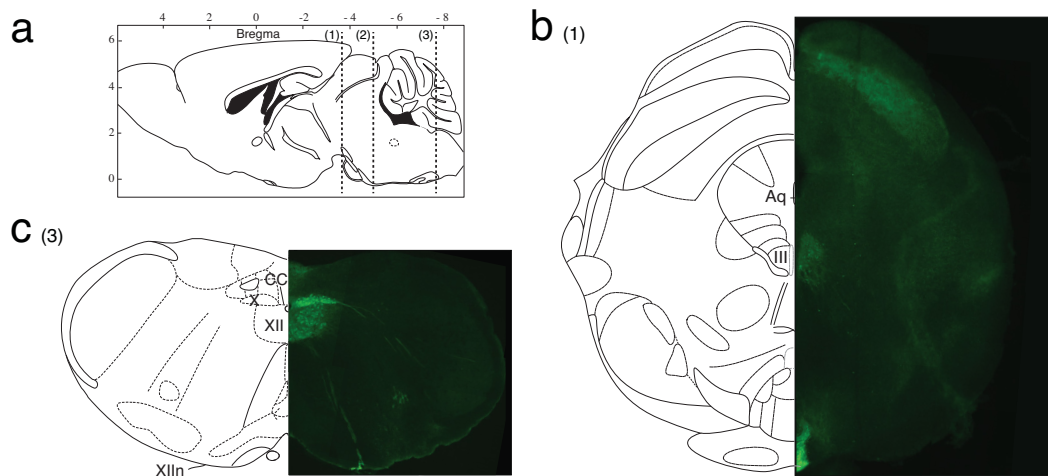


Abbildung 2.2: Schnittebenen

(a) Schematische Zeichnung eines sagittalen Hirnschnitts: (1) Ebene für Schnitte des Ncl. Oculomotorius; (2) Schnittebene für das Zurechtschneiden des Gehirns vor dem Aufkleben; (3) Ebene für Schnitte des Ncl. Hypoglossus. (b) Coronaler Schnitt in Ebene (1), links: Schematische Übersicht aus Atlas, III: Lage des Ncl. Oculomotorius, Aq: Aquädukt; rechts: Immunhistologische Färbung mit Antikörper gegen ChAT (grün) zur Markierung von Motoneuronen (c) Coronaler Schnitt in Ebene (3), links: Schematische Übersicht aus Atlas, XII: Lage des Ncl. Hypoglossus, XIIIn: N. Hypoglossus, X: Ncl. Dorsalis N. Vagi, CC: Zentralkanal; rechts: Immunhistologische Färbung mit Antikörper gegen ChAT (grün) zur Markierung von Motoneuronen (Atlasbilder modifiziert aus [Paxinos and Franklin, 2007], immunhistologische Bilder mit 4x Vergrößerung aufgenommen mit Fluoreszenzmikroskop BX61, Olympus, Hamburg)

Die Region des Ncl. Hypoglossus (siehe Abb. 2.2c, 4-5 Schnitte) wurde von ventral nach dorsal geschnitten, um das Zerebellum als stabilisierenden Hintergrund zu nutzen, die Region des Ncl. Oculomotorius (siehe Abb. 2.2b, 2-3 Schnitte) ebenfalls von ventral. Nach dem Schneiden wurde das Gewebe in die mit Carbogen (5% CO₂, 95% O₂) begaste Badlösung (Zusammensetzung siehe 2.7) überführt, bei 36 °C für 90 min inkubiert und dann bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.3 Elektrophysiologische Charakterisierung

2.3.1 Prinzip der *Patch-Clamp*-Ableitung

Erwin Neher und Bert Sakmann veröffentlichten 1976 eine Methode zur Messung von Strömen durch einzelne Ionenkanäle in Zellmembranstücken (*patch*) [Neher and Sakmann, 1976]. Für die sog. *Patch-Clamp*-Technik verwendeten sie stumpfe Glaspipetten, in die sie das Membranstück einsaugten und so einen hochohmigen Widerstand zwischen Zellmembran und Pipette herstellten, über den kaum Leckströme flossen. Über ein mit einer Silber/Silberchlorid-Elektrode in der Glaspipette verbundenes spezielles Verstärkersystem war es somit möglich, Ströme in der Größenordnung von wenigen Picoampere aufzulösen. Diese Methode wurde seitdem weiterentwickelt und ermöglicht heute eine Vielzahl von elektrophysiologischen Analysen von Einzelkanälen und Einzelzellen bis hin zu Netzwerkstudien. In der vorliegenden Arbeit fand sie Anwendung für alle elektrophysiologischen Charakterisierungen der Motoneuroneigenschaften und als Hilfsmittel für die fluorometrischen Messungen, um die Zellen mit dem Calciumindikator Fura-2 zu füllen.

Das Verstärkersystem bestand aus Vorverstärker und Hauptverstärker. Der Vorverstärker aus Widerstands- und Operationsverstärkerkomponenten ermöglichte über die Messung des Membranpotentials U_m und einen Rückkopplungswiderstand R eine Injektion von Strom in die Zelle, um diese auf einen bestimmten Spannungswert U_{soll} zu klemmen (*Voltage-Clamp*). Bei einer Änderung dieser Sollspannung flossen über die Zellmembran Ströme, die durch einen Operationsverstärker (OPA) registriert und zum Hauptverstärker geleitet wurden (siehe Abb. 2.3a). Der Hauptverstärker filterte, verstärkte und digitalisierte diese Signale, die dann an einem angeschlossenen Computer dokumentiert werden konnten.

Ein weiterer Schaltkreis im Vorverstärker ermöglichte außerdem, der Zelle einen artifizierten synaptischen Strom vorzugeben und die Spannungsantwort der Zelle zu registrieren (*Current-Clamp*). Dies wurde durch eine Spannungsfolger-Schaltung ermöglicht, bei der der Widerstand der Schaltung sehr viel größer war als der Eingangswiderstand zwischen Zelle und Pipette und somit war die Membranspannung genau ableitbar (siehe Abb. 2.3b). [Sherman-Gold, 2006; HEKA, 2004]

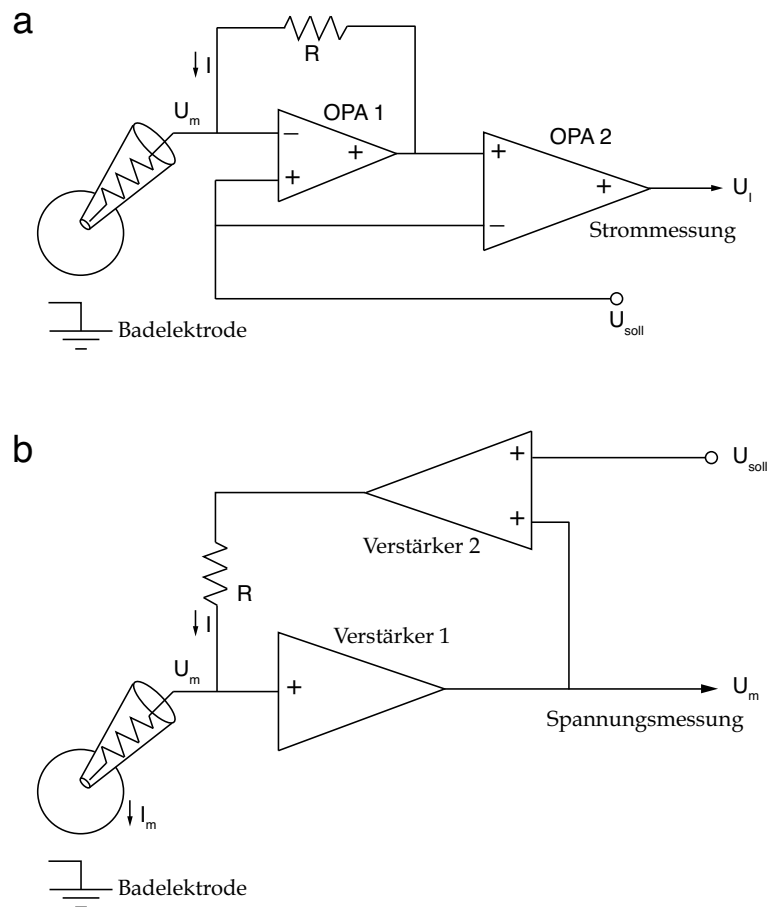


Abbildung 2.3: Schaltbilder der Vorverstärker

(a) Schaltbild für *Voltage-Clamp*-Messungen: Die Sollspannung U_{soll} wird mit der Membranspannung U_m im Operationsverstärker OPA1 verglichen und bei Abweichung über den Widerstand R ein Strom I in die Zelle injiziert. Über den Operationsverstärker OPA2 lassen sich die Ströme über die Zellmembran registrieren. (b) Schaltbild für *Current-Clamp*-Messungen: Ein Sollpotential U_{soll} generiert über den Widerstand R einen Strom I , der in die Zelle injiziert wird. Durch den Strom ändert sich das Membranpotential U_m , das von Verstärker1 gemessen wird. Der Membranstrom I_m fließt zur Badelektrode. U_m wird im Verstärker2 mit U_{soll} verglichen. Gemessen wird die Änderung des Membranpotentials. (verändert nach [Sherman-Gold, 2006])

2.3.2 Messplatz

Für die *Patch-Clamp*-Messungen ist ein elektrisch und mechanisch isolierter Messplatz essentiell (siehe Abb. 2.4). Ein Faraday-Käfig (Eigenanfertigung der dem Institut angeschlossenen Werkstatt) und ein schwingungsgedämpfter Tisch (VH3036W-OPT, Newport, Irvine, CA, USA) gewährleisteten dies. Vorverstärker mit Pipettenhalter und Hauptverstärker (EPC 10 double Patch-Clamp Amplifier, Heka Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz) sowie ein Computer mit dem Aquisitionsprogramm *Patchmaster* (Version 2.05, Heka Elektronik Dr. Schulze GmbH) dienten der Registrierung der elektrophysiologischen Signale. Am Pipettenhalter war ein Druckluftsystem angeschlossen, über das Über-

oder Unterdruck angelegt werden konnte. Bad- und Messelektrode waren aus Silberdraht. Beide wurden regelmäßig mit einer Natriumhypochloridlösung chloriert. Nur so konnte ein reproduzierbarer Elektronenfluss zwischen den Elektroden gewährleistet werden. Reines Silber ist zudem zytotoxisch [Sherman-Gold, 2006]. Zur feinen Steuerung der Pipette im Bad war ein Mikromanipulator mit drei Achsen angeschlossen (Mini 25, Luigs & Neumann, Ratingen). Die Hirnschnitte wurden zum Messen unter einem Durchlichtmikroskop (Axioskop 2 FS plus, Zeiss, Göttingen) in einer Badkammer (Slice mini chamber, Luigs & Neumann) mit Temperaturkontrolle (Badkontroller V, Luigs & Neumann) gelegt und über ein zum Teil gasdichtes Schlauchsystem (gasdichte Schläuche am Zufluss, Polyethylenschläuche am Abfluss, Silikonschläuche zur Verbindung) und eine Zweiwegepumpe (Ismatec, Glattbrugg, Schweiz) mit Lösung umspült. Der Visualisierung dienten ein 4x Objektiv (Achroplan 4x, Numerische Apertur 0.10, Zeiss), ein 40x Wasserimmersionsobjektiv (Achroplan 40x, Numerische Apertur 0.80, W Ph 2, Zeiss), ein in Reihe geschaltetes zusätzliches Linsensystem zur zwei- oder vierfachen Vergrößerung (Fourfold-Changer, Luigs & Neumann) und eine analoge Infrarotkamera mit Kontraststeuerelement (VX44, PCO, Till Photonics, Gräfelfing) sowie ein Analogbildschirm (Videomonitor WV-BM1410, Panasonic, Hamburg). Eine Kontrastverstärkung wurde erreicht durch einen Pseudo-Interferenzkontrast mittels Schrägbeleuchtung.

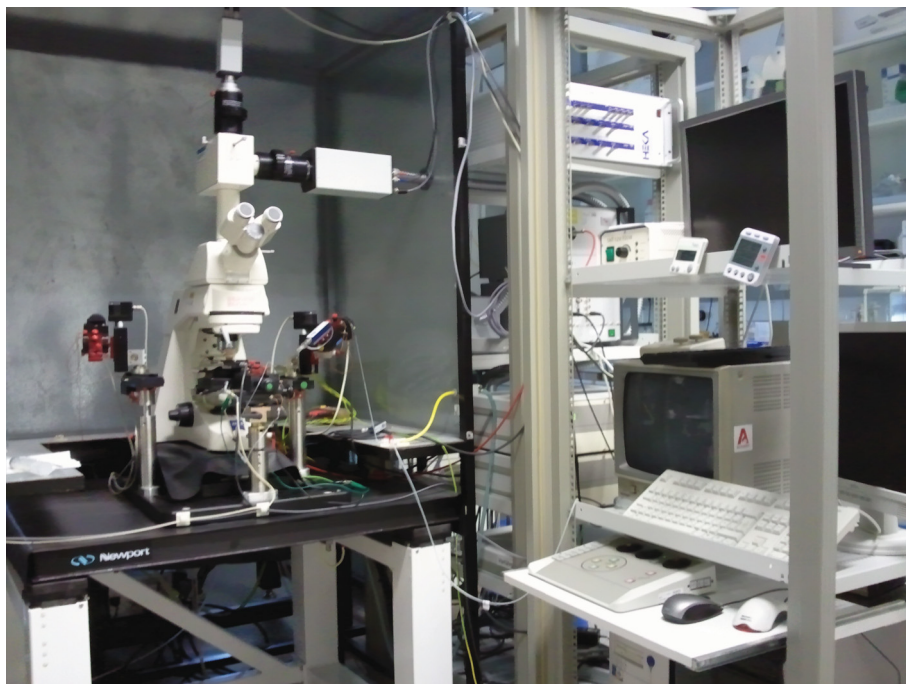


Abbildung 2.4: Messplatz

2.3.3 Generierung der Messkonfiguration

Zur Messung wurde ein Hirnschnitt nach der Inkubationszeit (siehe 2.2) in die Badkammer überführt und mittels eines Gitters aus C-förmig gebogenem Platindraht und gespannten Nylon-Fäden am Boden der Kammer fixiert. Der Schnitt wurde ständig mit einer 36 °C warmen ACSF-Badlösung (Zusammensetzung siehe 2.7) umspült, um die Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Auch die Badkammer war beheizt. Die Badlösung enthielt zusätzlich bei jeder der Messungen 10 μM CNQX und 4 μM SR95531, um die Zellen synaptisch zu isolieren und nur die intrinsischen Eigenschaften zu analysieren. CNQX ist ein Antagonist der AMPA-Rezeptoren, SR95531 blockiert GABA_A-Rezeptoren.

Nach dem Zentrieren der Schnitte und dem Auffinden der Kernregion unter dem Mikroskop wurde für jede Zelle eine neue Glaspipette vorbereitet. Mit einem Pipettenziehgerät (DMZ-Universal Puller, Zeitz, Martinsried) konnten mit gespeicherten Parametern (siehe Tabelle 2.3) aus Borosilicatglaskapillaren mit Filament Pipetten mit gewünschter Spitzenkonfiguration hergestellt werden. Der Parameter P(B) H (Hitze des finalen Zugs) wurde so gewählt, dass die Pipetten einen Widerstand von 3.5 - 4.5 M Ω aufwiesen.

P(A) Pre-Pull			
H	400	t(F1)	000
F(TH)	016	F1	000
s(TH)	019	s(F2)	000
t(H)	050	F2	000
s(H)	046	AD	121
P(B) Main-Pull			
H	variabel	t(F1)	090
F(TH)	018	F1	140
s(TH)	010	s(F2)	000
t(H)	030	F2	145
s(H)	000	AD	045

Tabelle 2.3: Parameter zum Ziehen von Glaspipetten

Der Widerstand wurde bestimmt nachdem die Pipette mit der je nach Experiment angepassten Kaliumgluconat-Lösung (KGlu) gefüllt, am Pipettenhalter des Vorverstärkers um die Elektrode befestigt und in die Badlösung eingetaucht, sowie ein Überdruck angelegt war. Es wurde dazu ein rechteckförmiger Spannungspuls durch die Elektrode appliziert und aus der resultierenden Stromantwort berechnete der angeschlossene Computer unter Anwendung des Ohm-Gesetzes den Pipettenwiderstand (siehe Abb. 2.5a).

Die KGlu-Lösung drückte man beim Füllen der Pipette durch einen Membranfilter mit 0.2 μm Porengröße, um kleine Partikel herauszufiltern, die die Pipettenöffnung verstopfen

könnten. Um gemessene Neurone nach histologischer Färbung nachweisen zu können (siehe 2.5), enthielt die Lösung bei allen gemessenen Oculomotoriusneuronen und bei einigen Hypoglossusneuronen 1 mg/ml Neurobiotin. Nach Bestimmung des Pipettenwiderstands musste ein Diffusionspotential (*offset potential*) am Verstärker abgeglichen werden, das durch die unterschiedlichen Lösungen in der Pipette und im Bad zwischen Mess- und Bad-elektrode entstand.

Das zu messende Motoneuron des Ncl. Hypoglossus (hMN) wurde nach seiner Größe und der Lage im Kern mit Hilfe des 40x Objektivs ausgewählt. Neurone mit einer Membrankapazität unter 30 pF wurden verworfen, um sicher die kleineren Interneurone oder Gliazellen von der Analyse auszuschließen. Generell wurden nur hMN aus der ventralen Hälfte des Kerns gemessen, um die Variabilität einzuschränken. Ventral liegt der Unterkern Ncl. Genioglossus [Krammer et al., 1979b], der besonders vulnerabel ist. Im Ncl. Oculomotorius wurden die Neurone (oMN) auch nach Lage und Größe gewählt. Nach Wahl der zu messenden Zelle wurde die Pipette an diese mit dem Mikromanipulator herangefahren, der angelegte Überdruck legte die Membran frei von umgebendem Gewebe. Unter zusätzlicher zweifacher Vergrößerung zur visuellen Kontrolle delte man die Zellmembran mit der Pipette leicht ein (siehe Abb. 2.5b), nahm dann den Überdruck weg und generierte durch Saugen an einem mit der Pipette verbundenen Schlauch einen leichten Unterdruck. Dadurch wurde die Zellmembran in die Pipette eingesogen und sollte mit der Pipettenwand eine hochohmige Verbindung generieren (*Gigaseal*, mindestens 1 G Ω , siehe Abb. 2.5c). Diese sogenannte *On-Cell*-Konfiguration war essentiell. Konnte sie nicht erreicht werden, wurde eine andere Zelle gewählt.

Durch die Widerstandszunahme wurde die Antwort auf den Rechteck-Puls kleiner, eine Umladung der Pipette und des Zellmembranteils in der Pipette erzeugte allerdings kapazitive Ströme mit kurzer Zeitkonstante (C_{fast}), die die physiologischen Messungen verfälscht hätten und deshalb über den Computer am Verstärker abgeglichen wurden (siehe Abb. 2.5d). Alle Messungen wurden in der sogenannten *Whole-Cell*-Konfiguration durchgeführt. Um diese zu erreichen, saugte man nun pulsartig an dem Schlauch und riss damit das Membranstück in der Pipette auf. Die Zellränder bildeten weiterhin einen hohen Abdichtwiderstand mit den Glaspipettenseiten, der Intrazellulärraum war aber direkt elektrisch zugänglich und die Intrazellulärflüssigkeit vermischte sich mit der KGlu-Lösung in der Pipette. Durch den Rechteckpuls wurde jetzt die gesamte Zelle umgeladen und man erhielt kapazitive Ströme mit langsamer Zeitkonstante (C_{slow} , entsprach der Membrankapazität C_m , siehe Abb. 2.5e). Die Zeitkonstante der Membran τ war abhängig vom Serienwiderstand R_s und der Membrankapazität C_m ($\tau = R_s \times C_m$), der Serienwiderstand entstand zwischen der Messelektrode und dem Zellsoma und war ein Maß für den elektrischen Zugang zur Zelle. Messungen mit einem R_s über 20 M Ω wurden verworfen, da die durch den Spannungsabfall über die Pipette entstehenden Zeit- und Spannungsfehler die Ergebnisse

verfälschten. C_m war ein Maß für die Zelloberfläche ($1 \mu\text{F}$ pro 1 cm^2) und die Zellgröße der gemessenen Zellen ließ sich somit abschätzen. C_{slow} wurde ebenfalls kompensiert, R_s wurde über den Computer berechnet und bei Spannungsklemme-Messungen zum Teil kompensiert.

Waren diese Konfigurationen und Einstellungen erreicht, konnten die Messungen durchgeführt werden (siehe 2.3.4). Wurde die Zelle während der Messung durch Diffusion mit Neurobiotin gefüllt, musste am Ende der Messung die Pipette sehr langsam von der Zelle zurückgezogen werden. Es entstand dabei eine *Outside-Out*-Konfiguration, die die Zelle intakt ließ. Die Zellmembran schloss sich und in der Pipette haftete ein Membranstück mit der Membranaußenseite in Richtung der Badlösung. [Numberger and Draguhn, 1996]

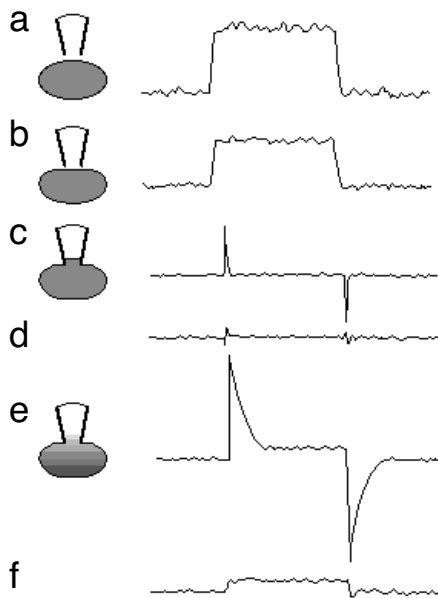


Abbildung 2.5: Konfigurationen und Stromantwort auf einen Testpuls

(a) Taucht die Pipette in die Badlösung entsteht eine Stromantwort auf einen rechteckigen Spannungspuls, abhängig vom Pipettenwiderstand. (b) Die Pipette wird an die Zelle herangefahren, der Widerstand erhöht sich. (c) Durch Entfernen des Überdrucks und leichtes Saugen entsteht ein hochohmiger Widerstand (*On-Cell*-Konfiguration). Es werden kapazitive Ströme mit schneller Zeitkonstante (C_{fast}) registriert. (d) Diese werden kompensiert. (e) Durch pulsartiges Saugen gelangt man in die *Whole-Cell*-Konfiguration. Es werden kapazitive Ströme mit langsamer Zeitkonstante (C_{slow}) registriert. (f) Auch diese werden kompensiert. (aus [Jackson, 2001])

2.3.4 Messprotokolle

Bei *Voltage-Clamp*-Messungen wurde der Serienwiderstand zu 50-60% kompensiert. Alle Daten aus *Current-Clamp*-Messungen wurden nicht für einen Spannungsabfall an der Pipette kompensiert (*bridge balance*), da der verwendete Verstärker eine manuelle Einstellung nicht erlaubte. Das *Liquid-Junction*-Potential, ein gleich bleibender Spannungsfehler von etwa 8 mV, der durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Lösung in der Pipette und der Badlösung entstand, wurde bei den folgenden Potentialangaben nicht korrigiert. Die Digitalisierung der Daten wurde unter Beachtung des Nyquist-Shannon-Abtasttheorems vorgenommen. Danach kann man bei einer Digitalisierung ein analoges Signal nur dann verlustfrei rekonstruieren, wenn die Abtastfrequenz größer ist als das Doppelte der

im Ursprungssignal vorkommenden Maximalfrequenz [Nyquist, 2002]. Die Digitalisierung erfolgte daher mit einer Frequenz von 20 kHz, um die schnellen Potentialänderungen während Aktionspotentialen nicht zu stark zu verfälschen. Zwei Bessel-Tiefpassfilter mit 10 bzw. 5 kHz Filterfrequenz lieferten ein artefaktfreies, unverzerrtes Signal.

Die ausführliche Grundcharakterisierung von Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus wurde mit der KGlu-Pipettenlösung ohne Fura-2 oder ATP durchgeführt. Während der Messung der Calciumsignale wurden zusätzlich elektrophysiologische Parameter erhoben mit der für Fluoreszenzmessungen modifizierten Pipettenlösung. Die Charakterisierung der Oculomotorius-Neurone erfolgte nur mit der modifizierten Lösung und den Stimulationsprotokollen der fluorometrischen Messungen (siehe 2.4.3).

Protokolle zur elektrophysiologischen Grundcharakterisierung

Die Messung aktiver und passiver elektrophysiologischer Charakteristika erfolgte im *Whole-Cell Current-Clamp*-Modus. Die Zellkapazität zur Abschätzung der Zellgröße wurde aus den Werten der Kapazitätskompensation abgelesen. Nachdem die *Whole-Cell*-Konfiguration erreicht war, wurde nach mindestens 30 s Equilibrierungszeit das Ruhemembranpotential abgelesen. Zur Beschreibung der Erregbarkeit einer Zelle (Steigung der Frequenz-Strom-Kurve), sowie für die Bestimmung der Maximalfrequenz, der einzelnen Aktionspotentialparameter und der Nachhyperpolarisation nach einer Stimulation (*compound afterhyperpolarisation*, cAHP) wurden anschließend rechteckförmige, Stromimpulse mit Dauer von 1 s in Schritten von 100 pA in die Zelle appliziert und die Spannungsantwort der Zelle registriert (siehe Abb. 2.6a). Ausgegangen wurde von einem Haltepotential von -60 mV. Zwischen den Schritten lag eine Stimulationspause von 5 s. Die Anzahl der Schritte variierte je nach Reaktion der Zellen. Eine Abschätzung des nötigen Stroms zum Erreichen der Aktionspotentialschwelle wurde mit einer rampenförmigen Strominjektion (2 s pro Schenkel) in 50 pA Schritten, ausgehend von -60 mV Haltepotential, ermöglicht (siehe Abb. 2.6b). Eine hyperpolarisierende, rechteckförmige Strominjektion in Schritten von -50 pA und 2 s Dauer, ausgehend vom Ruhemembranpotential, erlaubte die Registrierung des Eingangswiderstands und des depolarisierenden Einflusses hyperpolarisationsaktivierter Ionenkanäle (siehe Abb. 2.6c).

Protokolle zur Registrierung persistierender Einwärtsströme

Persistierende Einwärtsströme (PIC) wurden im *Voltage-Clamp*-Modus gemessen. Eine langsame Spannungsrampe (5 s pro Schenkel) in 10 mV Schritten, ausgehend von -70 mV Haltepotential diente als Protokoll (siehe Abb. 2.6d). Während dieser langsamen Rampe sollten alle schnellen Einwärtsströme durch spannungsabhängige Natriumkanäle (Na_v) durch Inaktivierung der Kanäle blockiert und persistierende, langsame Ströme sichtbar werden. Ein Klemmen aller distalen Teile einer komplex gebauten Zelle auf eine gemeinsame Spannung ist jedoch nicht gut möglich (*Space-Clamp*-Problem [Armstrong and Gilly,

1992]), weswegen in den Registrierungen meist Ströme ungeklemmter Aktionspotentiale auftraten. Nach der Aufnahme der Stromantworten wurde 300 nM TTX über die Bad-perfusion appliziert und nach 3 min die Rampen wiederholt. Hierbei wurden alle TTX-sensitiven Natriumkanäle blockiert und durch Vergleich der Ströme vor und nach Blockade TTX-sensitive Natriumströme einzeln analysierbar. In jedem Hirnschnitt wurde nur eine Zelle gemessen, um Effekte der Kanalblockade trotz Auswaschens des Pharmakons zu vermeiden.

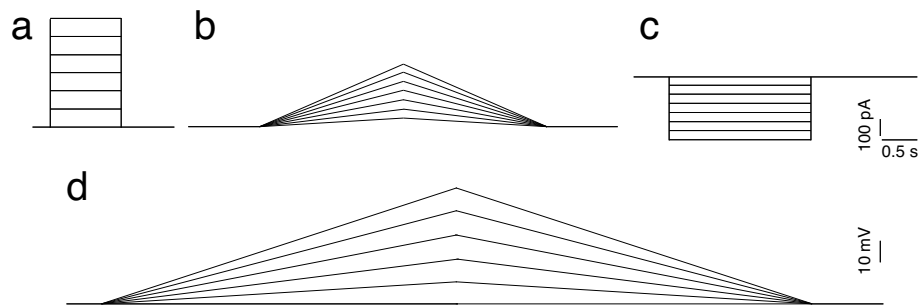


Abbildung 2.6: Stimulationsprotokolle

(a) Depolarisation durch Rechteckpulse mit einer Schrittgröße von 100 pA bis zum Depolarisationsblock. (b) Stromrampe mit einer Schrittgröße von 50 pA. (c) Hyperpolarisation durch Rechteckpulse. Schrittgröße 50 pA bis zu einer Hyperpolarisation auf -80 mV. (d) Spannungsrampe mit sechs Schritten von je 10 mV.

2.3.5 Datenanalyse und Auswertung

Die Auswertung der elektrophysiologischen Daten erfolgte nach einem Export aus dem Analyseprogramm *Fitmaster* (Version 2.43, Heka Elektronik Dr. Schulze GmbH) mittels *IgorPro* (Version 6.02A, WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) unter Anwendung der Programmerweiterung *NeuroMatic* (Version 2.00, Thinkrandom, University College London, UK) und eigener Programmcodes. Zur Auswertung der Aktionspotentialschwelle und -dauer wurde ein nicht kommerziell erhältlicher *IgorPro*-Code verwendet, der von Dr. Jan Gründemann (Friedrich-Miescher-Institut, Basel, Schweiz) programmiert wurde. Zur Organisation der Daten wurde das Tabellenkalkulationsprogramm von *NeoOffice* (Version 3.1.2, Sun Microsystems, Santa Clara, CA, USA), zur Darstellung und statistischen Auswertung das Programm *Prism 5* (Version 5.0c, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet. Die Auftrennung der einzelnen Datenpunkte in den Streudiagrammen in y-Achsen-Richtung erfolgte unbeeinflussbar durch *Prism 5*, um ein Überlappen von Punkten mit gleichem x-Wert zu vermeiden und hat keine inhaltliche Aussage.

Auswertung der Daten der elektrophysiologischen Grundcharakterisierung

Die rechteckförmigen Strompulse depolarisierten die gemessene Zelle zuerst passiv. Sobald die Potential-Schwelle zum Öffnen spannungsabhängiger Natriumkanäle erreicht war, generierten die Zellen bei weiterer Depolarisation Aktionspotentiale mit steigender Frequenz. Trug man die jeweilige Frequenz (f) gegen den applizierten Strom (I) auf, konnte man aus der Steigung dieser f - I -Kurve die Erregbarkeit der Zelle abschätzen. Die Kurve verlief allerdings nicht bei jeder der injizierten Stromstärken linear, sondern war zu Beginn sehr steil, dann über einen großen Bereich hinweg linear und flachte mit hoher Stromstärke ab und näherte sich einem maximalen Frequenzwert an. Für die Bestimmung der Steigung wurde eine Linearfunktion an den mittleren linearen Teil der Kurve angepasst. Bei hoher Strominjektion wurden die Zellen so stark depolarisiert, dass sich die spannungsabhängigen Natriumkanäle nicht wieder aus der Inaktivierung erholen konnten. Die Zelle konnte nicht mehr über die Stimulationszeit von 1 s hinweg Aktionspotentiale generieren, sie befand sich im sog. Depolarisationsblock. Die Aktionspotentialfrequenz vor Erreichen des Depolarisationsblocks wurde als Maximalfrequenz registriert.

Wegen der geringeren Verfügbarkeit von Na_v und der Aktivierung oder Inaktivierung anderer spannungsabhängiger Kanäle bei steigender Depolarisation änderte sich auch die Form der Aktionspotentiale mit steigender Stimulation. Die Strukturanalyse einzelner Aktionspotentiale sollte deshalb zur Normierung bei einer bestimmten Stimulationsstärke stattfinden. Ein variabler Eingangswiderstand jedoch machte dies schwierig und in der vorliegenden Arbeit wurde stattdessen die Auswertung bei normierter Aktionspotentialfrequenz durchgeführt. Alle Aktionspotentialparameter wurden bei dem Stimulationsschritt ausgewertet, der eine Frequenz von 40 Hz erzeugte. Diese Frequenz entsprach einer niedrigen physiologischen Aktivität wie sie etwa bei atmungsabhängigen Zungenbewegungen im N. Hypoglossus messbar ist (siehe 4.3.2) und konnte von allen gemessenen Motoneuronen erzeugt werden. Die ausgewerteten Parameter zur Beschreibung der Aktionspotentiale waren Schwelle, Amplitude (von Schwelle zu Maximum), Dauer auf Höhe der Schwelle und Amplitude der Nachhyperpolarisation (AHP, von Schwelle zu Minimum). Für jede Zelle wurde der Mittelwert der Parameter von drei Aktionspotentialen als mit anderen Zellen zu vergleichender Wert gebildet. Ebenfalls bei einem Stimulationsschritt, der eine Frequenz von 40 Hz erzeugte, wurde die Nachhyperpolarisation nach der Stimulation (cAHP) ausgewertet. Es wurde die Amplitude des cAHP bestimmt und der Repolarisationsphase bis zum Haltepotential eine Exponentialfunktion ($U(t) = U_{max} \times e^{-1/\tau}$) angeglichen. Der Zeitpunkt, an dem diese Exponentialfunktion auf $1/e \approx 37\%$ des Maximalwertes abgefallen war, wird als Zeitkonstante τ bezeichnet. Diese wurde ebenfalls ausgewertet.

Die Rheobase ist die Stromstärke, die nötig ist, eine Membran so weit zu depolarisieren, dass ein Aktionspotential entstehen kann. Sie konnte mit Hilfe der Stromrampen berechnet werden. Am aufsteigenden Schenkel der Stromrampe wurden außerdem persistierende

Kanäle aktiviert, die am absteigenden Schenkel der Rampe die Rheobase verringerten. Daher wurde die Rheobase am Beginn und am Ende der Aktionspotentialgenerierung ausgewertet.

Die Injektion negativer Stromimpulse hyperpolarisierte die Zellen. Aus der Steigung der Strom-Spannungskurve ließ sich der Eingangswiderstand der Zellen berechnen ($R = U/I$). Hyperpolarisationsaktivierte Kanäle (HCN, *hyperpolarization activated and cyclic nucleotid gated ion channel*) führten bei starker Hyperpolarisation der Zellen zu einer aktiven leichten Depolarisation. Die Amplitude dieser Depolarisation bis zu dem Erreichen eines stabilen Potentials wird als *sag* bezeichnet und war ein Maß für die Verfügbarkeit von HCN-Kanälen.

Auswertung der Daten der Registrierung persistierender Einwärtsströme

Die Daten aus den *Voltage-Clamp*-Experimenten wurden vor dem Export aus *Fitmaster* zusätzlich mit 100 Hz digital gefiltert. Analysiert wurden die Ströme bei einer Spannungsrampe von -70 mV auf -20 mV (10 mV/s), da die gewünschten Einwärtsströme bei -20 mV bereits maximal aktiviert waren. Bei steileren Rampen wurden die ungeklemmten Aktionspotentialströme und die einsetzenden Auswärtsströme zu dominant. Zur Bestimmung der TTX-sensitiven persistierenden Natrium-Einwärtsströme wurde zuerst für die Stromantwort vor Blockade und für die Stromantwort nach TTX-Applikation eine Korrektur für die passiven Leckströme vorgenommen. Dazu wurden die passiven Antworten der Zelle auf die jeweiligen Rampen von -70 mV auf -60 mV durch Multiplikation hochskaliert (siehe graue Spur in Abb. 2.7a) und von der auszuwertenden Stromantwort (Rampe von -70 mV auf -20 mV, schwarze Spur in Abb. 2.7a) abgezogen. So erhielt man die aktiven Antworten der Zelle auf Depolarisation (siehe Abb. 2.7b). Anschließend wurde die Stromantwort nach TTX-Applikation von der Antwort vor der Blockade abgezogen. Die erhaltene Kurve wurde noch gegen die angelegte Spannung aufgetragen (siehe Abb. 2.7c) und der maximale Auswärtsstrom bestimmt. Neben der maximalen Stromamplitude konnten durch Auftragen der Leitfähigkeit g (normiert auf die maximale Leitfähigkeit g_{max}) gegen die Spannung und dem Anpassen einer sigmoidalen Ausgleichskurve (Boltzmann-Anpassung, siehe Abb. 2.7d) auch die halbmaximale Kanalaktivierung V_{50} und aus der Steilheit der Kurve die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung bestimmt werden. Die Leitfähigkeit G berechnete sich aus $G = \frac{I}{E - E_{rev}}$ mit I = Strom, E = Membranpotential und E_{rev} = Umkehrpotential des gewünschten Ions (für Natrium hier 130 mV), die Formel für die Boltzmann-Anpassung lautete:

$$\frac{G}{G_{max}} = G_0 + \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_{50} - \text{Membranpotential}}{\text{Steigung}}\right)}$$

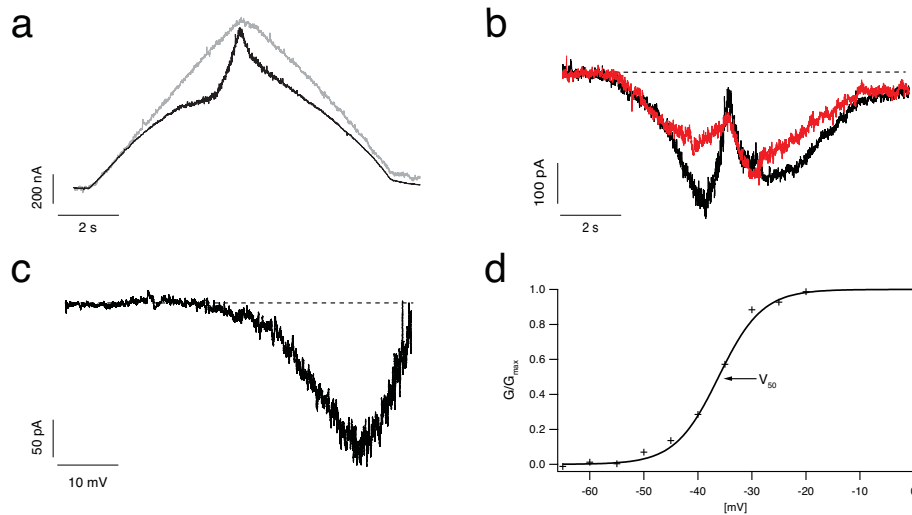


Abbildung 2.7: Auswertung von persistierenden Einwärtsströmen

(a) schwarz: Stromantwort auf Spannungsrampe von -70 mV auf -20 mV; grau: hochskalierte Stromantwort auf Spannungsrampe von -70 mV auf -60 mV (b) aktive Stromantwort, schwarz: Kontrollbedingungen; rot: nach Applikation von TTX; gestrichelte Linie entspricht 0 pA (c) TTX-sensitiver Einwärtsstrom; gestrichelte Linie entspricht 0 pA (d) Boltzmann-Anpassung an Leitfähigkeit-Potential-Kurve; V₅₀: halbmaximale Kanalaktivierung

2.4 Fluorometrische Messung der Calciumkonzentration und des mitochondrialen Membranpotentials

2.4.1 Prinzip der fluorometrischen Messungen

Neben elektrophysiologischen Messungen ist die Registrierung von Signalen fluoreszierender Moleküle und der Analyse der Fluoreszenzintensität (Fluorometrie) in lebenden Zellen eine weitere Methode zur Aufzeichnung physiologischer Ereignisse. Unter Fluoreszenz versteht man eine kurzzeitige Lichtemission eines Moleküls, das zuvor mit höherenergetischem Licht angeregt wurde (siehe Abb. 2.8). Die Anregungswellenlänge ist dabei spezifisch für jedes Fluoreszenzmolekül, genauso wie die entsprechende längerwellige Emission. Dieses biologische Phänomen wurde erstmals von George Gabriel Stokes im Jahr 1852 beschrieben [Stokes, 1852]. Den Unterschied zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge bezeichnet man demnach als *Stokes-Shift*. Er ist die Grundlage der Aufzeichnung von Emissionen mehrerer Fluoreszenzstoffe parallel, wenn diese einen unterschiedlichen *Stokes-Shift* haben und somit bei gleicher Anregungswellenlänge mit unterschiedlicher Emissionswellenlänge fluoreszieren.

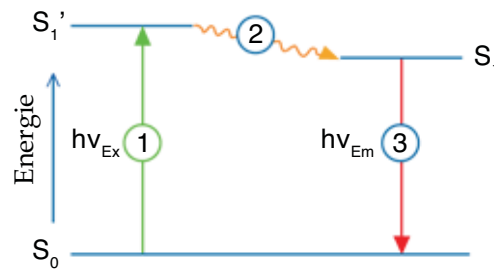


Abbildung 2.8: Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung der Fluoreszenzentstehung

(1) Anregung: Eine Lichtquelle sendet ein Photon der Energie $h\nu_{Ex}$ auf einen Fluoreszenzfarbstoff, bei dem ein Elektron vom Grundzustand S_0 auf einen energetisch höheren, angeregten Zustand S_1' angehoben wird. (2) Andauernde Anregung (etwa 1 - 10 ns): Der Farbstoff ändert seine Konformation und kann mit umgebenden Molekülen interagieren, wobei das angeregte Elektron einen Teil der Energie verliert (Zustand S_1). (3) Emission: Das Elektron fällt zurück in den Grundzustand S_0 und gibt dabei ein Photon mit geringerer Energie $h\nu_{Em}$, also längerer Wellenlänge ab. (verändert aus [Johnson and Spence, 2011])

Als Lichtquelle werden meist Quecksilber- oder Xenondampflampen verwendet. Diese ermöglichen eine hohe Lichtintensität bei definierter Wellenlänge. Neben der Lichtquelle zur Anregung der Farbstoffe wird noch eine Kamera benötigt, die die Lichtemissionen auffängt und analysierbar macht. Dies wird in der Regel durch die *Charge-Coupled Device*-Technologie (CCD) ermöglicht. Ein CCD-Photosensor enthält einen dünnen Silikon-Halbleiter, aufgeteilt in viele lichtsensitive Elemente, die beim Einfangen von Photonen Elektronen freisetzen. Je stärker das Emissionssignal eines zur Fluoreszenz angeregten Moleküls, desto mehr Photonen und schließlich Elektronen werden gebildet, weitergeleitet und ein Wert für die Lichtintensität an einem bestimmten Bildelement (Pixel) wird ausgelesen. Das digitalisierte Bild kann anschließend an einem angeschlossenen Computer wieder zusammengesetzt werden. [Nikon, 2011]

Mit einem Fluoreszenzmolekül, einer Lichtquelle und einer CCD-Kamera können so z.B. einzelne Zelltypen, markierte Proteine und Signalstoffe auch in lebenden Gewebeproben oder sogar *in vivo* in ihrer Verbreitung, Struktur und örtlich-zeitlicher Dynamik qualitativ und quantitativ untersucht werden. Nachteile dieser Methode sind die geringe Eindringtiefe in das Gewebe und eine Phototoxizität durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies aus den Farbstoffen bei Anregung.

Einige endogene Moleküle wie NAD oder FAD, zeigen eine Autofluoreszenz. Die wichtigsten Bausteine der Bildgebung in lebenden Zellen sind jedoch fluoreszierende Stoffe. Diese werden entweder in einer Zelle artifiziell exprimiert (z.B. das grün fluoreszierende Protein GFP [Shimomura et al., 1962] oder der Chloridindikatorfarbstoff Clomeleon [Kuner and Augustine, 2000]) oder durch Inkubation mit dem Farbstoff vom Gewebe aufgenommen (wie das hier verwendete Rhodamine123 zur Abschätzung des mitochondrialen Membranpotentials). Während einer *Whole-Cell*-Messung können Fluoreszenzfarbstoffe durch Diffusion

auch direkt aus der Pipettenlösung in die zu analysierende Zelle gelangen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, um die Motoneurone mit dem Farbstoff Fura-2 zu befüllen, der es erlaubte, die Calciumkonzentration im Zytoplasma abzuschätzen.

Rhodamine123 (Rh123) ist ein Fluoreszenzfarbstoff (Struktur siehe Abb 2.9a), der sich in hyperpolarisierten Zellkompartimenten, vor allem in aktiven Mitochondrien, anreichert. Dort wird dessen Fluoreszenz gelöscht (engl. *quenching*). Depolarisiert das Potential des Mitochondriums, wird Rh123 in das Zytoplasma freigesetzt und ein Fluoreszenzanstieg proportional zur Potentialänderung wird messbar. Rh123 ermöglichte es somit, eine Membranpotentialänderung von Mitochondrien abzuschätzen [Dyken and Stout, 2001; Duchen and Biscoe, 1992]. Die beste Anregung erfolgt bei 510 nm, das Maximum des Emissionsspektrums liegt bei 540 nm (siehe Abb. 2.9b).

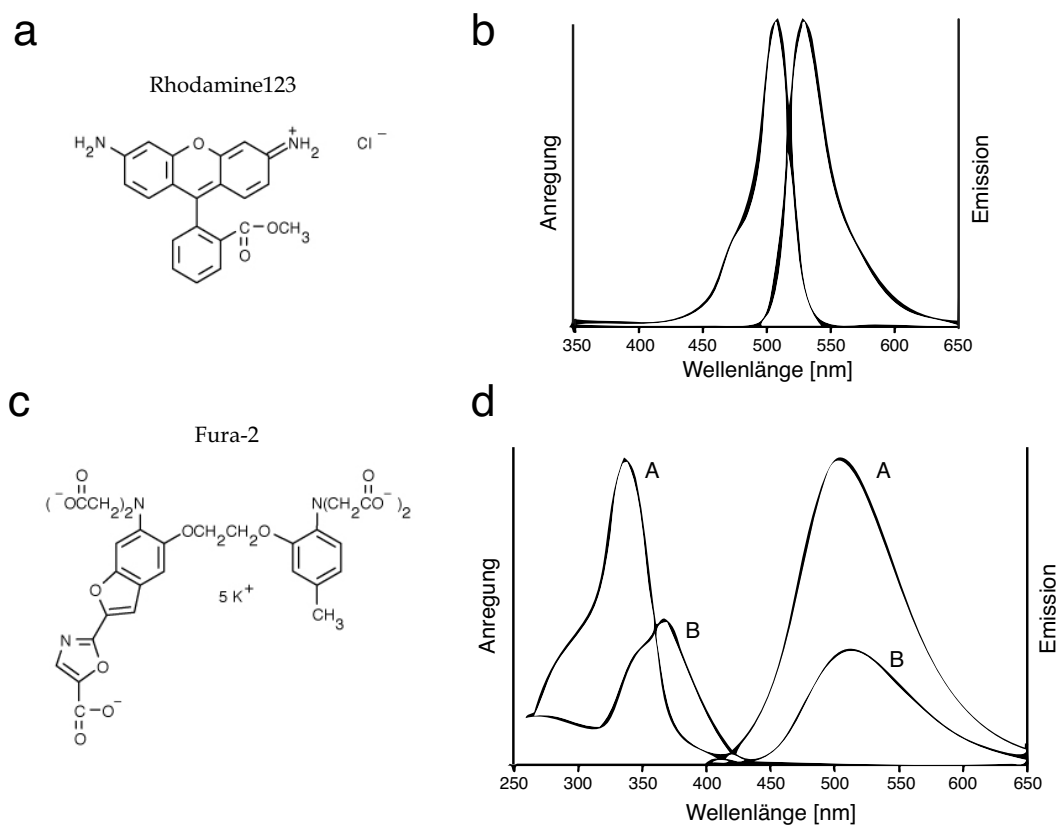


Abbildung 2.9: Struktur und Absorptionsspektren von Rh123 und Fura-2

(a) Struktur von Rh123 (b) Anregungsspektrum (links) und Emissionsspektrum (rechts) von Rh123 (c) Struktur von Fura-2 (d) Anregungsspektren (links) und Emissionsspektren (rechts) von Fura-2; A: ohne Calciumbindung, B: mit Calciumbindung (nach [Johnson and Spence, 2011])

Die Anregungswellenlänge von Fura-2 (Struktur siehe Abb. 2.9c) variiert je nachdem, ob an der modifizierten Polyamino-Carboxylsäurekette ein Calciumion gebunden hat (Anregungsmaximum bei 380 nm) oder nicht (Anregungsmaximum bei 340 nm). Unabhängig von der Calciumbindung fluoresziert Fura-2 bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei allen Anregungswellenlängen bei 510 nm (siehe Abb. 2.9d). Fura-2 ist somit ein Indikatorfarbstoff für die freie Calciumkonzentration in der Zelle. Wegen der Verschiebung der Anregungswellenlängen je nach Calciumbindung lässt sich ein Verhältnis der Emissionen nach zwei verschiedenen Anregungen ausrechnen (ratiometrische Calciummessung). Dadurch lassen sich Unterschiede zwischen verschiedenen Zellen ausgleichen, die nicht auf unterschiedlicher Calciumkonzentration beruhen, sondern bedingt sind durch variable Farbstoffmengen in der Zelle oder die Tiefe der Zellen im Hirnschnitt. [Grynkiewicz et al., 1985]

Neben Fura-2 gibt es noch eine Reihe anderer Calciumindikator-Farbstoffe, die sich voneinander in der Affinität zu Calcium unterscheiden. Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war ein hochaffiner Farbstoff wie Fura-2 (Dissoziationskonstante $K_d = 140$ nM [Johnson and Spence, 2011], eigene Bestimmung der K_d siehe 2.4.5) nötig, um freie Calciumionen bei niedriger intrazellulärer Konzentration zu registrieren. Der Nachteil war allerdings eine Störung des endogenen Calciumpuffers und der Calciumtransienten sowie eine evtl. Unterschätzung der Calciumkonzentrationen bei hohen Mengen [Stout and Reynolds, 1999; Johnson and Spence, 2011].

2.4.2 Messplatz

Zusätzlich zu den unter 2.3.2 aufgeführten Komponenten für elektrophysiologische Messungen enthielt der Messplatz Geräte zur Anregung der Fluoreszenz in den Hirnschnitten, zur Registrierung der Emission und zur Datenaufzeichnung. Die Lichtquelle war ein Monochromator (Polychrome V, Till Photonics) mit Xenonlampe, der über ein Galvanometer schnell zwischen vorgegebenen Wellenlängen wechseln konnte. Über ein Quarzfaserkabel und einen Epifluoreszenzkondensor war dieser mit dem Mikroskop verbunden. Wellenlänge und Lichtintensität wurde über eine Steuereinheit reguliert (*imaging control unit*, Till Photonics). Die Emissionssignale wurden über wellenlängenspezifische Filter (AHF Analysetechnik, Tübingen) an eine digitale CCD-Kamera geleitet (IMAGO QE, Till Photonics; Quantumeffizienz 60%, 1376 x 1040 Pixel, Pixelgröße 6.45 x 6.45 μm , 16 MHz Abtastfrequenz, 12 bit Digitalisierungsrate, gekühlt). Für die Messungen der Fura-2 Emission wurde ein Strahlenteiler (HC Strahlenteiler BS409), ein Bandpassfilter (BrightLine HC 510/84) und ein Ortsfilter (Clean Up 395 SP) verwendet (siehe Abb. 2.10a), für die Rh123 Messungen ein Strahlenteiler (Strahlenteiler 495 DCXRUV) sowie ein optischer Bandpassfilter (BrightLine HC 550/88) (siehe Abb. 2.10b).

Die Steuerung und die Datenaufzeichnung erfolgten mit den Programmen *LiveAquisition* (Version 1.6, Till Photonics) und Arivis Browser 2D (Arivis, Rostock).

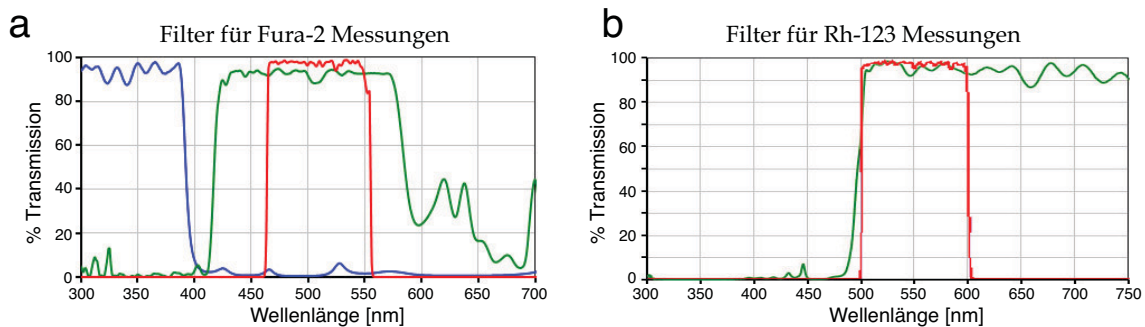


Abbildung 2.10: Optische Filter

blau: Ortsfilter, grün: Strahlenteiler, rot: Bandpassfilter (a) Filter für Fura-2 Fluoreszenzmessungen (b) Filter für Rh123 Fluoreszenzmessungen (nach Abbildungen auf [AHF-Analysetechnik, 2011])

2.4.3 Messprotokolle

Bei allen fluorometrischen Messungen befand sich mit $100\ \mu\text{M}$ Pyridoxalphosphat-Azophenyl-Disulfonat (PPADS) zusätzlich ein Antagonist für ionotrope P2X-ATP-Rezeptoren in der Badlösung. Die gemessenen Motoneurone exprimierten viele dieser Rezeptoren und depolarisierten daher stark, wenn die ATP-haltige Pipettenlösung durch den angelegten Überdruck mit der Zelle in Berührung kam. Um die Messbarkeit zu gewährleisten, war der Antagonist essentiell. Es wurde eine andere KGlu-Lösung als für reine elektrophysiologische Messungen verwendet. Sie enthielt keinen zusätzlichen Calciumpuffer und war mit ATP versetzt, um energieabhängige Prozesse nicht durch das Auswaschen von endogenem ATP zu stören. Zum Teil mussten auch pharmakologische Substanzen über die Pipettenlösung in die Zelle gebracht werden, wenn diese nicht über Zellmembranen diffundieren konnten. Dies war der Fall für den Antagonisten des mitochondrialen Uniporters Ru360 ($20\ \mu\text{M}$) und den Antagonisten des Natrium-Calcium-Austauschers der Mitochondrien CGP37157 ($15\ \mu\text{M}$). Außerdem befand sich der Calciumindikator Fura-2 ($100\ \mu\text{M}$) in der Pipettenlösung, um spezifisch einzelne Zellen durch Diffusion nach Erreichen der *Whole-Cell*-Konfiguration zu füllen. Eine Messung wurde daher erst nach 7-8 min durchgeführt, wenn die Fura-2-Lösung in der Zelle equilibriert war (siehe Abb. 3.8b). Auch das vorher in die Zellumgebung freigesetzte Fura-2 wurde in dieser Zeit ausgewaschen. Während der Wartezeit konnte die Zelle im Steuerprogramm *LiveAquisition* als Region von Interesse (ROI) markiert werden. Es wurde das komplette Zellsoma erfasst. Die Aufnahme der Signale erfolgte mit einer Zusammenfassung von 4×4 Pixeln, um eine höhere Lichtempfindlichkeit auf Kosten der Auflösung zu erreichen.

Protokoll für die fluorometrischen Messungen der Calciumkonzentration

Die Fura-2-Fluoreszenz wurde als Indikator für die Calciumkonzentration in der Zelle ratio-metrisch gemessen. Für ein calciumunabhängiges Signal regte man den Farbstoff mit einer Wellenlänge von 357 nm und einer Belichtungszeit von 20 ms an, für die calciumabhängigen Signale mit 380 nm Wellenlänge und 20 ms Belichtungszeit. Die Abtastfrequenz betrug 2 Hz. Eine Änderung der Calciumkonzentration zur Analyse der Calciumhomöostase wurde durch Stimulation der Zelle mittels Strominjektion über die Messelektrode erreicht. Wie bei der elektrophysiologischen Grundcharakterisierung wurde dazu ein rechteckförmiger Stromimpuls von 1 s Dauer appliziert (siehe Abb. 2.6a). Die Schrittgrößen variierten zwischen 100 und 500 pA bis zum Depolarisationsblock. Der zeitliche Abstand zwischen den Stimulationsschritten wurde so groß gewählt, dass nach jeder Stimulation das Calciumsignal wieder auf einem Basalwert war, um eine Summierung der Signale zu vermeiden (in der Regel 45-90 s). Wurden Blocker nicht über die Glaspipette, sondern über die Bad-perfusion eingewaschen, war eine Inkubationszeit von mindestens 15 min einzuhalten. Dies war der Fall für: 200 nM FCCP (Verringerung der Triebkraft für die mitochondriale Calciumaufnahme durch Entkopplung der Mitochondrien bei hMN), 80 nM FCCP (Verringerung der Triebkraft für die mitochondriale Calciumaufnahme durch Entkopplung der Mitochondrien bei oMN), 2 μ M Cyclosporin A (Blockade der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore), 1 μ M Thapsigargin (Blockade der Calcium-ATPase am Endoplasmatischen Retikulum).

Protokoll zur Registrierung des mitochondrialen Membranpotentials

Die Fluoreszenz von Rh123 wurde zur Abschätzung des mitochondrialen Membranpotentials verwendet. Der zu analysierende Schnitt wurde dazu 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur in einer Lösung von 0.25 μ g/ml Rh123 in ACSF inkubiert und anschließend zum Auswaschen des nicht aufgenommenen Farbstoffs 30 min bei 36 °C in der Badkammer gewaschen. Nach der Etablierung einer *Whole-Cell*-Konfiguration und der Equilibrierung des Fura-2-Signals applizierte man über die Badperfusion 5 μ M FCCP, um die Mitochondrien komplett zu depolarisieren und alles in die Mitochondrien aufgenommene Rh123 freizusetzen. Das Membranpotential der Zelle blieb während der kompletten Messung stabil. Die Fluoreszenzanregung des freigesetzten Rh123 erfolgte mit 485 nm, einer Belichtungszeit von 10 ms und einer Abtastfrequenz von 1 Hz. Auf jedem Schnitt wurde nur eine Zelle gemessen.

2.4.4 Datenanalyse und Auswertung

Die Programme *LiveAquisition* und *Arivis Browser* zeichneten die Lichtintensitäten der Emission bei jeder Anregung als Zahlenwert auf. Die Auswertung erfolgte mit *IgorPro* (Version 6.02A, WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) unter Anwendung der Programm-

erweiterung *NeuroMatic* (Version 2.00, Thinkrandom, University College London, UK), die Darstellung und statistische Auswertung mit *Prism 5* (Version 5.0c, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Auswertung der Daten der fluorometrischen Messungen der Calciumkonzentration

Die Intensitäten der zwei verschiedenen Emissionssignale (F) der ratiometrischen Calciummessung wurden dividiert (357 nm-Signal / 380 nm-Signal), auf den Basalwert normiert (F/F_0) und gegen eine Zeitachse aufgetragen (siehe Abb. 2.11a-c). Bei jeder elektrischen Stimulation entstand ein Anstieg des normierten ratiometrischen Calciumsignals entsprechend der Calciumbeladung der Zelle, der einzeln analysiert wurde. Bestimmt wurde die Amplitude des Signals, die Zeitkonstante τ des Abfalls (wenn eine exponentielle Anpassung möglich war, τ entsprach dem Zeitpunkt an dem die Kurve auf $1/e \approx 37\%$ des Maximalwertes abgefallen war) und die Fläche unter der Kurve von 90% des Maximums bis zu einem Basalwert (siehe Abb. 2.11d). Zur statistischen Auswertung wurden die fluorometrischen Signale der Stimulationsschritte aller Zellen miteinander verglichen, die eine Aktionspotentialfrequenz von 40 Hz erzeugten, sowie die, die eine maximale Entladungsfrequenz hervorriefen.

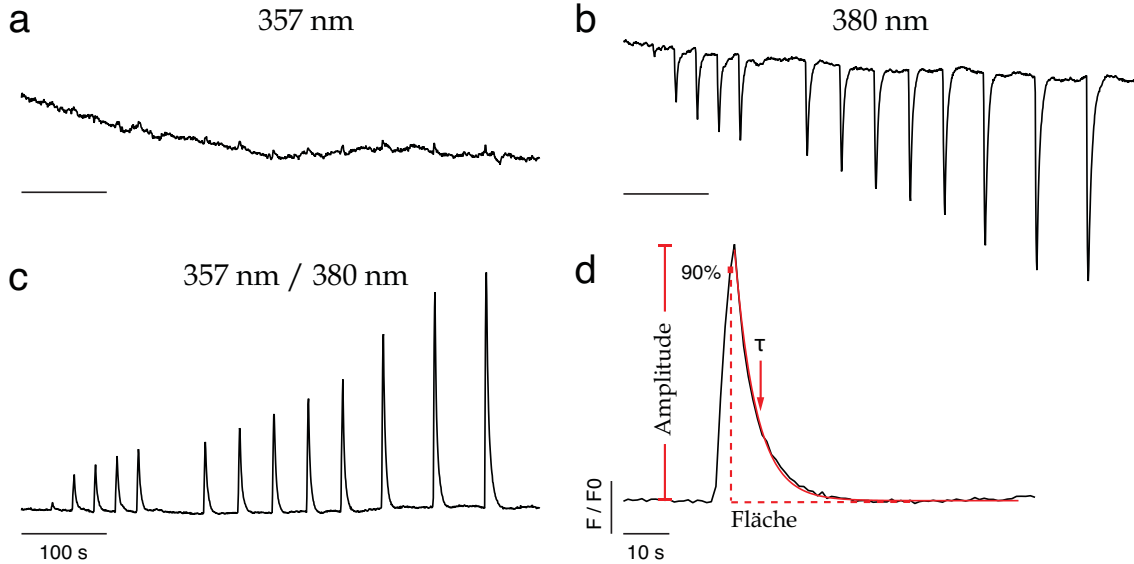


Abbildung 2.11: Auswertung der Fura-2-Signale

(a) Emissionssignal nach Anregung mit 357 nm und mehrfacher elektrischer Stimulation (b) Emissionssignal nach Anregung mit 380 nm und mehrfacher elektrischer Stimulation (c) Ratiometrisches Signal berechnet aus (a) / (b). (d) Normiertes ratiometrisches Signal nach einer einzelnen Stimulation, Auswertung der Amplitude, der Fläche des Signals von 90% des Maximums bis zum Basalwert und der exponentiellen Ausgleichskurve zur Bestimmung der Zeitkonstante τ des Calciumsignalabfalls.

Auswertung der Daten der Rh123-Messungen

Für die Auswertung der Rh123-Signale wurde die Fluoreszenzänderung der Emission auf den Basalwert normiert (F/F_0) und die Amplitude der Änderung nach Applikation von FCCP abgelesen.

2.4.5 Bestimmung der Dissoziationskonstante

Aus der Amplitude der Fluoreszenzsignale ließen sich Unterschiede in der Calciumbeladung der Motoneurone abschätzen. Es war zudem möglich die Fluoreszenzintensität über ein Kalibrierungsverfahren mit der genauen Calciumkonzentration zu korrelieren. Dazu musste die Dissoziationskonstante K_d des Fura-2 unter den vorliegenden Messbedingungen bestimmt werden. K_d ist unter anderem abhängig von der Temperatur, dem pH und der Ionenstärke [Uto et al., 1991].

Alle Fluoreszenzmessungen der vorliegenden Arbeit wurden bei 36 °C durchgeführt und Lösungen mit einem pH von 7.35 verwendet. Somit wurde auch die Kalibrierung mit diesen Parametern nach einem Protokoll von Invitrogen [Invitrogen, 2011] durchgeführt. Zuerst wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt aus 10 μ M Fura-2-haltigen Lösungen mit definierter Konzentration an Ca-EGTA (Ethylenglycol-bis(Aminoethylether)-Tetraessigsäure) oder K₂-EGTA (kommertielle Calcium-Kalibrierlösungen). In den Lösungen lag Calcium im Gleichgewicht frei oder an EGTA (Ethylenglycol-bis-Aminoethylether-Tetraessigsäure) gebunden vor, abhängig von der K_d des EGTA unter den Messbedingungen (hier 54.7 nM [Invitrogen, 2011]). Aus dem Produkt des Ca-EGTA/K₂-EGTA-Konzentrationsverhältnisses mit der K_d von EGTA konnten die freien Calciumkonzentrationen in den Lösungen der Verdünnungsreihe berechnet werden. Diese Lösungen wurden am Messplatz mit 357 nm und 380 nm Wellenlänge angeregt und die Emission aufgezeichnet. Aus der ratiometrisch normalisierten Fluoreszenzintensität (357 nm/380 nm), aufgetragen gegen die freie Calciumkonzentration, ließ sich eine Kalibrierkurve generieren, die eine Bestimmung der Calciumkonzentrationen bei allen durchgeführten Messungen erlaubte. Trug man $\log_{10}((R-R_{min})/(R-R_{max})) \cdot (F_{380min}/F_{380max})$ gegen $\log_{10}[\text{Calcium}]_{frei}$ auf (siehe Abb. 2.12), konnte aus dem x-Achsenabschnitt der Kurve und inversem Logarithmus die K_d von Fura-2 bestimmt werden. R steht für den ratiometrischen Wert der Emission (357 nm/380 nm), R_{min} für den ratiometrischen Wert der Emission der Lösung ohne freiem Calcium, R_{max} für den Wert mit maximaler freier Calciumkonzentration. F_{380min} bezeichnet den Emissionswert nach Anregung mit 380 nm bei der Lösung ohne freiem Calcium, F_{380max} den Wert nach Anregung mit 380 nm bei der Lösung mit maximaler freier Calciumkonzentration. Die hiermit bestimmte Dissoziationskonstante von Fura-2 unter den hier vorhandenen Messbedingungen betrug 154 nM.

Diese *in vitro*-Kalibrierung berücksichtigt zwar pH und Temperatur der Messbedingungen, in den Zellen liegen allerdings deutlich andere Ionenverhältnisse und endogene Calciumpuf-

fersysteme vor, die die K_d verändern können [Owen, 1991]. Eine Angabe von genauen Calciumkonzentrationen als Ergebnisse der fluorometrischen Messungen ist somit auch nach der durchgeführten *in vitro*-Kalibrierung nicht möglich. Deshalb wurden alle Ergebnisse aufgeführt als auf den Basalwert normierte Fluoreszenzintensitäten F/F_0 .

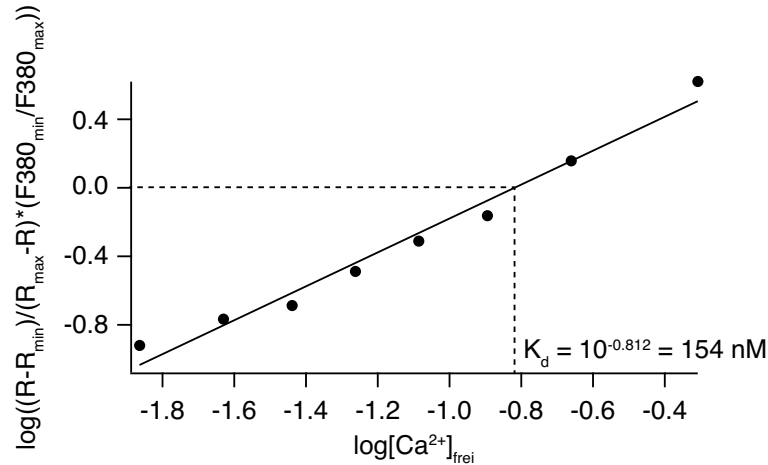


Abbildung 2.12: Kalibrierung der Fluoreszenzsignale

Zur Berechnung der Dissoziationskonstante von Fura-2 und der Korrelation von Fluoreszenzintensität und Calciumkonzentration. Aus dem x-Achsen-Abschnitt ließ sich die K_d bestimmen.

2.5 Immunhistochemie

Wurden Zellen beim Messen für den Identitätsnachweis mit Neurobiotin gefüllt, konnte der Schnitt anschließend mit einer Lösung aus Paraformaldehyd und Pikrinsäure über Nacht bei 4 °C fixiert und bis zur weiteren Verarbeitung in einer Natriumazidlösung bei 4 °C gelagert werden.

Ein Markergen für Motoneurone ist die Cholin-Acetyltransferase (ChAT). Fixierte Schnitte wurden daher mit einem Antikörper gegen ChAT und einem fluoreszierenden Sekundärantikörper gefärbt. Neurobiotin konnte man durch Zugabe von fluoreszenzgekoppeltem Streptavidin sichtbar machen. Durch eine Doppelmarkierung von ChAT und Neurobiotin ließ sich eine gemessene Zelle als Motoneuron identifizieren. Dieser Nachweis wurde bei allen Oculomotoriusneuronen vorgenommen, da die Abgrenzung des Kerns gegen andere Neuronenpopulationen unter dem Mikroskop am Messplatz nicht deutlich war. Hypoglossusneurone wurden nur vereinzelt mit Neurobiotin gefüllt und gefärbt, da dieser Kern sehr homogen und gut abgegrenzt war und durch Lage und Größe der Zellen andere Neuronenpopulationen sicher ausgeschlossen werden konnten.

Die Immunfärbungen und deren Dokumentation wurde größtenteils mit technischer Hilfe von Sylvie Kutterer durchgeführt.

Protokoll:

- Schnitte in einem 5 ml Schnappdeckelglas 4x 10 min bei Raumtemperatur (RT) in 0.1 M PBS waschen
- 3 h unter Schütteln bei RT mit 1 ml Blockierlösung (siehe 2.7) unspezifische Bindestellen blockieren
- über Nacht unter Schütteln bei RT mit Primärantikörper ChAT (1:250, siehe Tabelle 2.4) inkubieren
- 4x 10 min bei RT in 0.1 M PBS waschen
- 24 h unter Schütteln bei RT mit Sekundärantikörper Anti-*goat* A488 (1:750, siehe Tabelle 2.4) und Streptavidin A568 (1:1000, siehe Tabelle 2.4) inkubieren
- 4x 10 min bei RT in 0.1 M PBS waschen
- 15 min mit Kupfersulfatlösung inkubieren zur Verringerung unspezifischer Autofluoreszenz
- 2x 10 min bei RT in 0.1 M PBS waschen
- Aufziehen der Schnitte auf unbeschichtete gewaschene Objektträger und Trocknung
- Eindecken mit Vectashield H1000, Versiegeln der Ränder des Deckglases mit Nagellack und Aufbewahrung im Dunkeln bei 4 °C

Reagenz	Donor	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Anti-ChAT	Ziege (<i>goat</i>)	Chemicon	AB144P	1:250 (in <i>Carrierlösung</i>)
AlexaFluor488-Anti- <i>goat</i>	Esel (<i>donkey</i>)	MolecularProbes	A11055	1:750 (in <i>Carrierlösung</i>)
AlexaFluor568-Streptavidin		MolecularProbes	S11226	1:1000 (in <i>Carrierlösung</i>)

Tabelle 2.4: Antikörper

Die fluoreszenzmarkierten Schnitte wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskops (LSM 510, Zeiss, Göttingen) dokumentiert. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit der LSM 5 Image Examiner-Software (Version 3.2, Zeiss, Göttingen).

2.6 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwerts angegeben. Zum statistischen Vergleich zweier Gruppen (z.B. ein elektrophysiologischer Parameter von wt und G93A) auf Unterschiede in deren Mittelwert wurde der Student's t-Test für unverbundene normalverteilte Stichproben durchgeführt, für mehrere zu vergleichende Gruppen eine Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*, ANOVA). Die Normalverteilung ließ sich zuvor mit einem D'Agostino-Pearson-Test überprüfen. Die meisten der Daten waren normalverteilt. Ein Test auf Normalverteilung hat jedoch wenig Aussagekraft bei kleinen Stichproben und bei großen Stichproben ist ein t-Test und eine Varianzanalyse robust gegenüber Abweichungen von der Normalverteilung, die angewandten Tests konnten somit mit großer Aussagekraft verwendet werden [Stevens, 2007]. Einige Kontrolldaten wurden für mehr als einen Test, etwa zum Vergleich zwischen unterschiedlichen pharmakologischen Beeinflussungen, herangezogen. Eine alpha-Fehler-Korrektur wurde nicht vorgenommen. Als signifikant unterschiedlich wurden Vergleiche bezeichnet deren Test einen p-Wert von $p < 0.05$ ergab. Diese wurden mit * gekennzeichnet. Geringere p-Werte wurden mit ** ($p < 0.01$) und *** ($p < 0.001$) markiert. N bezeichnet die Tierzahl, n steht für die Zellzahl einer Stichprobe.

2.7 Lösungen

Lösungen für die Genotypisierung

Lysispuffer	1 M Tris-Base pH 8, 0.5 M EDTA pH 8, 10% SDS, 2 M NaCl, 2 μ g/ml Proteinase K
TAE-Puffer	40 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure

Lösungen für die Immunhistochemie

Blockierlösung	0.5% Triton, 10% Normales Eselserum, in 0.1 M PBS
Carrierlösung	0.5% Triton, 1% Normales Eselserum, in 0.1 M PBS
Kupfersulfatlösung	10 mM Ammoniumacetat, 1 mM Kupfersulfat
Natriumazid-Aufbewahrungslösung	10% Saccharose, 0.05% Natriumazid, in 0.1 M PBS

Paraformaldehyd-Fixierlösung	4% Paraformaldehyd, 15% Pikrinsäure, in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.4
PBS	kommertiell erhältliche Tabletten (Sigma-Aldrich, München), pH 7.4
Phosphatpuffer	260 mM Natriumdihydrogenphosphat, 190 mM Dinatriumhydrogenphosphat

Lösungen für die *Patch-Clamp*- und fluorometrischen Messungen

KGlu-Lösung <i>Patch-Clamp</i> -Messungen	135 mM KGlu, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.1 mM EGTA, 2 mM MgCl ₂ , pH 7.35 mit KOH
KGlu-Lösung für Fluoreszenz-Messungen	135 mM KGlu, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl ₂ , 0.1 mM Fura-2, 2 mM Na-ATP, 0.1 mM Li-GTP, pH 7.35 mit KOH
ACSF-Badlösung	125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 25 mM NaHCO ₃ , 1.25 mM NaH ₂ PO ₄ , 2.5 mM Glucose, 22.5 mM Sucrose, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , begast mit Carbogen (5% CO ₂ , 95% O ₂)
ACSF-Perfusionslösung	125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 25 mM NaHCO ₃ , 1.25 mM NaH ₂ PO ₄ , 2.5 mM Glucose, 50 mM Sucrose, 0.1 mM CaCl ₂ , 6 mM MgCl ₂ , 3 mM Kynurensäure, begast mit Carbogen

2.8 Material

Alle zuvor erwähnten Chemikalien, die im Folgenden nicht genannten werden, stammten von Sigma-Aldrich, München. Standardeinweg- und Verbrauchsmaterial sind nicht aufgeführt.

Chemikalien für die Genotypisierung

Agarose	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Invitrogen, Eugene, OR, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	JT Baker, Deventer Holland
<i>Primer</i>	MWG-Biotech, Ebersberg
Proteinase K	Roche, Grenzach-Wyhlen
SDS	Roth, Karlsruhe
steriles Wasser	Braun, Melsungen
SybrSafe	Invitrogen, Eugene, OR, USA

Chemikalien und Material für die *Patch-Clamp*- und fluorometrischen Messungen

CaCl ₂	AppliChem, Darmstadt
Calcium-Kalibrierlösungen	Invitrogen, Eugene, OR, US
CGP37157	Biotrend, Köln
CsA	Biotrend, Köln
CNQX	Biotrend, Köln
Domitor	Pfizer, Berlin
FCCP	Tocris, Bristol, UK
Fura-2	Invitrogen, Eugene, OR, USA
EGTA	Roth, Karlsruhe
Heparin	Ratiopharm, Ulm
HEPES	Roth, Karlsruhe
Ketamin	Inresa, Freiburg
MgCl ₂	AppliChem, Darmstadt
Natriumhypochlorid	Roth, Karlsruhe
Neurobiotin	Vector Laboratories, Petersborough, UK
PPADS	Biotrend, Köln
Rhodamine 123	Invitrogen, Eugene, OR, USA
Ru360	Calbiochem, Darmstadt
SR95531	Biotrend, Köln
Thapsigargin	Biotrend, Köln
TTX	Alomone Labs, Jerusalem, Israel

Borosilicatglaskapillaren mit Filament (GC150TF-10)	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
gasdichte Schläuche (Thomafluid EPDM/PP Pumpenschlauch)	Reichert Chemietechnik, Heidelberg
Membranfilter	Nalgene, Roskilde, Dänemark
Platindraht	WPI, Sarasota, FL, USA
Polyethylenschläuche	Portex SIMS, Ashfort, UK
Silberdraht	Goodfellow, Bad Nauheim
Silikonschläuche	BioRad, München
Vibratom-Klingen	Campden-Instruments, Leicester, UK

Chemikalien für die Immunhistochemie

Ammoniumacetat	AppliChem, Darmstadt
Esenserum	Vector Laboratories, Petersborough, UK
PFA	Merck, Darmstadt
Vectashield	Vector Laboratories, Petersborough, UK
Triton	AppliChem, Darmstadt

Ergebnisse

Eine Charakterisierung und der Vergleich von adulten Motoneuronen aus Wildtyp- und G93A-Mäusen im Endstadium sowie zwischen vulnerablen und resistenten Motoneuronen wurde mit Hilfe elektrophysiologischer und fluorometrischer Messungen vorgenommen. Zum Teil wurden die Ergebnisse bereits in Form von Kongress-*Abstracts* veröffentlicht [Fuchs et al., 2008, 2009a,b, 2010b, 2011a,b].

3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung von adulten Motoneuronen

Eine elektrophysiologische Grundcharakterisierung dient der Beschreibung von aktiven und passiven Eigenschaften einer Zelle. Aus den verschiedenen Parametern lassen sich Hinweise auf Ionenkanalbesatz und Leitfähigkeiten der Neuronenmembran finden, die Reaktion der Neurone auf externe Stimulation analysieren und intrazelluläre Mechanismen wie zum Beispiel die Calciumhomöostase indirekt beschreiben. Diese Erkenntnisse ermöglichen außerdem Schlüsse auf mögliche toxische Belastungen der Zellen während physiologischer Aktivität.

Die Charakterisierung der adulten wt Motoneurone sollte in der vorliegenden Arbeit einen Vergleich zu den bereits von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten Daten aus juvenilen MN (siehe 1.3.1) ermöglichen und so Schlüsse über die entwicklungsabhängigen Änderungen der Eigenschaften erlauben. Der Vergleich der Parameter zwischen wt und G93A adulten MN diene der Analyse von potentiell pathologischen Veränderungen, ausgelöst durch die mutierte SOD1 und als Hinweis für Pathomechanismen der ALS an einem fortgeschrittenen Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs. Anders als durch die Messungen in juvenilen Tieren, die zwar frühe Veränderungen beschreiben und diese als Ursache für eine spätere Neurodegeneration postulieren, konnten hier Eigenschaften von MN zu einem Zeitpunkt aufgedeckt werden, an dem die Charakteristika direkte zytotoxische Auswirkungen haben können. Auch der Vergleich zwischen der vulnerablen Motoneuronpopulation des Ncl. Hypoglossus und den resistenten oculomotorischen Neuronen diene dem direkten Nachweis pathologischer Mechanismen einer differentiellen Vulnerabilität.

3.1.1 Charakterisierung der Motoneurone des Ncl. Hypoglossus

Motoneurone des Ncl. Hypoglossus (hMN) wurden nach ihrer Größe und der Lage im ventralen Unterkern ausgewählt. Zum Teil wurden die MN zur anschließenden Identifikation während der Messung mit Neurobiotin gefüllt und ihre Identität mit dem Motoneuronmarker Cholin-Acetyltransferase (ChAT) histologisch überprüft (siehe Abb. 3.1).

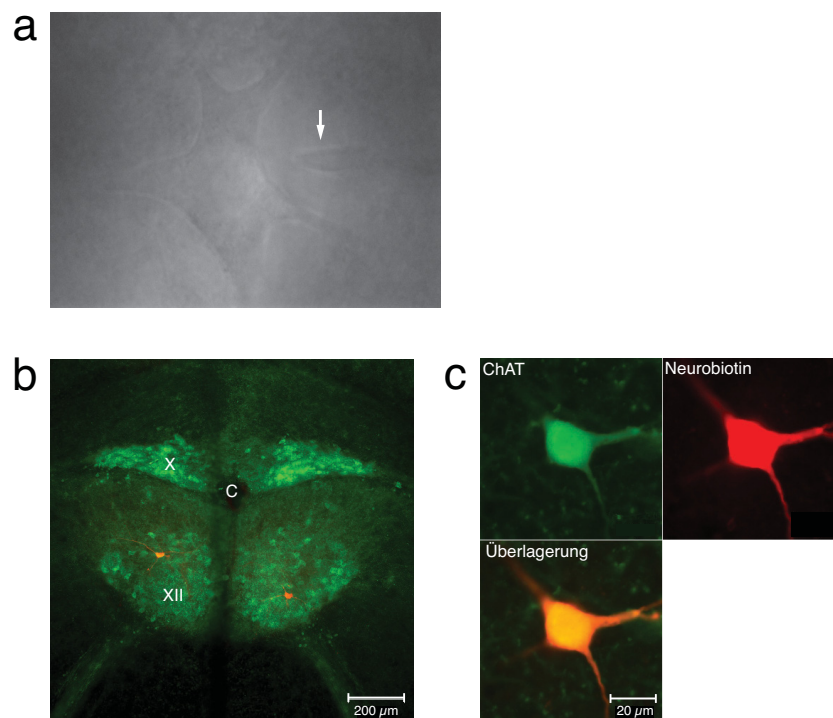


Abbildung 3.1: Identifikation gemessener hMN

(a) Motoneuron im Ncl. Hypoglossus; Pfeil: Messelektrode. Vergrößerung 80fach. (b) ChAT-Färbung (grün) eines Hirnschnittes mit zwei gemessenen Zellen (gefüllt mit Neurobiotin, rot) im Ncl. Hypoglossus (XII) zum Nachweis der Lage im Kern. X: Ncl. Dorsalis N. Vagi, C: Zentralkanal (c) ChAT-Färbung (grün) eines gemessenen Neurons (gefüllt mit Neurobiotin, rot) im Ncl. Hypoglossus zum Nachweis der Motoneuronidentität

3.1.1.1 Elektrophysiologische Grundcharakterisierung

Vergleich elektrophysiologischer Eigenschaften adulter Motoneurone des Ncl. Hypoglossus von Wildtyp- und G93A-Mäusen

Zur Grundcharakterisierung wurden die passiven und aktiven Eigenschaften adulter hMN aus N=25 Wildtypmäusen mit einem Alter von $P129 \pm 9$ und aus N=26 G93A Mäuse mit einem Alter von $P126 \pm 7$ aufgezeichnet und analysiert. Alle G93A Tiere befanden sich im Endstadium der Krankheit. Die Daten sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst und in Abb. 3.2, 3.3 und 3.4 visualisiert.

Parameter	wt (n=78)	G93A (n=96)	t-Test
Membrankapazität [pF]	54.37 \pm 1.69	53.35 \pm 1.34	p=0.6333
Eingangswiderstand [M Ω]	100.50 \pm 5.74 n=51	105.60 \pm 4.17 n=84	p=0.4611
Ruhepotential [mV]	-49.52 \pm 0.43 n=64	-51.10 \pm 0.35 n=84	p=0.0048**
sag [mV]	11.62 \pm 0.46 n=48	11.39 \pm 0.34 n=77	p=0.6914
AP Schwelle [mV]	-30.40 \pm 0.53	-28.72 \pm 0.57	p=0.0333*
AP Dauer [μ s]	893.80 \pm 22.14	922.10 \pm 19.88	p=0.3411
AP Amplitude [mV]	71.15 \pm 0.92	70.87 \pm 0.91	p=0.8334
AHP Amplitude [mV]	19.70 \pm 0.43	18.54 \pm 0.48	p=0.0748
Steigung f-I [Hz/pA]	0.075 \pm 0.004	0.071 \pm 0.004	p=0.4239
Maximalfrequenz [Hz]	145.80 \pm 5.40	145.00 \pm 5.20	p=0.9116
cAHP Amplitude [mV]	12.92 \pm 0.51	13.93 \pm 0.33	p=0.0865
cAHP Zeitkonstante [ms]	71.99 \pm 3.18	64.30 \pm 2.29	p=0.0518
Rheobase Beginn [pA]	242.20 \pm 19.97 n=34	217.40 \pm 20.29 n=36	p=0.3869
Rheobase Ende [pA]	304.70 \pm 22.14 n=34	244.40 \pm 20.34 n=36	p=0.0487*

Tabelle 3.1: Elektrophysiologische Charakteristika von adulten Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus

Student's t-Test zum Vergleich der Mittelwerte von wt und G93A, * p<0.05, ** p<0.01, wt: N=25, G93A: N=26

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen wt und G93A hMN in der Membrankapazität oder dem Eingangswiderstand (siehe Abb. 3.2a). Das Ruhemembranpotential war signifikant hyperpolarisierter in den G93A Mäusen. Dabei waren sowohl bei wt als auch bei G93A etwa 15% der Zellen spontanaktiv. Alle Zellen zeigten bei Hyperpolarisation auf -80 mV eine spontane HCN-bedingte Depolarisation (*sag*), deren Betrag nicht unterschiedlich war zwischen wt und G93A (siehe Abb. 3.2b).

Bei der Auswertung der Form eines einzelnen Aktionspotentials bei 40 Hz ließ sich für den Potentialwert an der Schwelle ein signifikanter Unterschied feststellen. Amplitude und Dauer des Aktionspotentials, gemessen an der Schwelle, waren nicht signifikant unterschiedlich. Dies war trotz Tendenz zu einem größeren Wert bei wt hMN auch der Fall für die Amplitude der schnellen Nachhyperpolarisation des einzelnen Aktionspotentials (siehe Abb. 3.3a). Die Steigung der Frequenz-Strom-Kurven war bei den adulten hMN ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich zwischen wt und G93A, genauso wie die maximale Aktionspotentialfrequenz (siehe Abb. 3.3b).

Auch die Amplitude der Nachhyperpolarisation nach 1 s Entladung mit 40 Hz (cAHP) war nicht statistisch signifikant unterschiedlich, zeigte jedoch eine starke Tendenz zu einem größeren Wert bei G93A Mäusen. Die Zeitkonstante τ der Repolarisation der cAHP war

tendenziell, aber nicht signifikant größer in wt hMN (siehe Abb. 3.4a).

Die Rheobase bei aufsteigender Rampe unterschied sich nicht signifikant zwischen wt und G93A, bei der absteigenden Rampe jedoch war eine signifikant geringere Strominjektion zum Auslösen des letzten Aktionspotentials notwendig (siehe Abb. 3.4b).

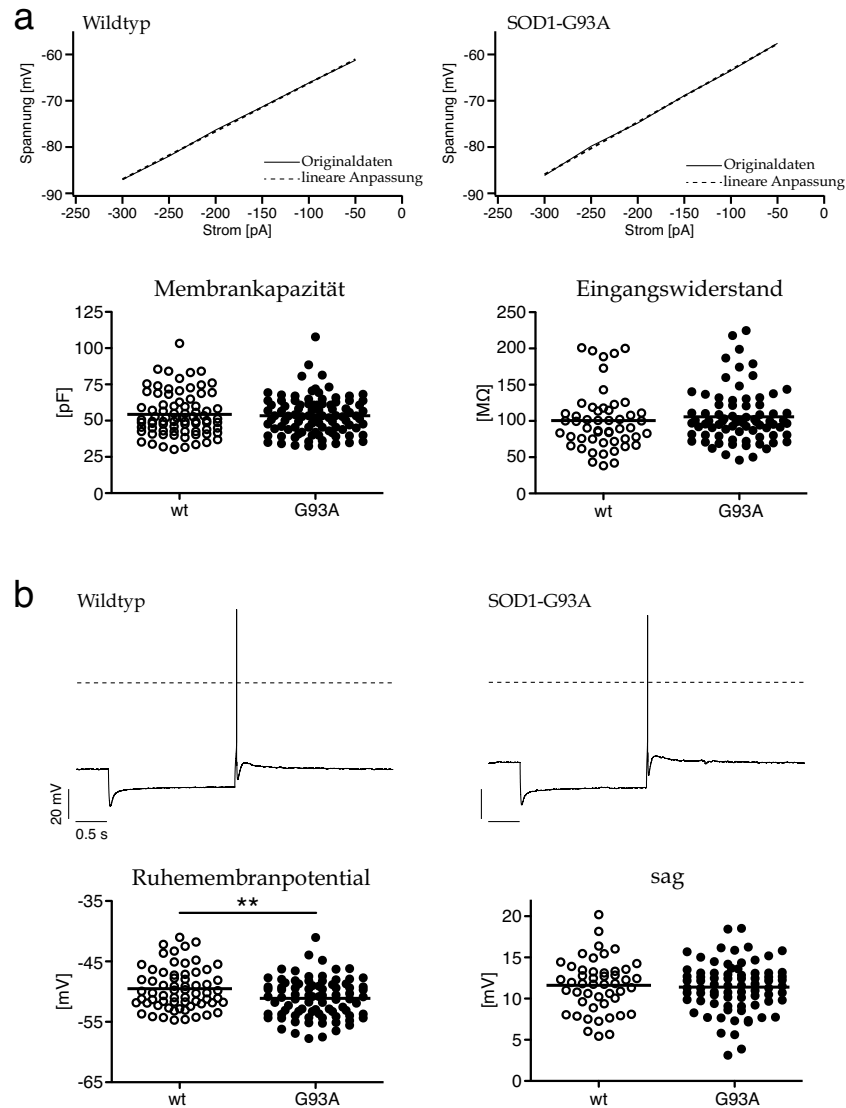


Abbildung 3.2: Passive Eigenschaften und Hyperpolarisationscharakteristika von Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus

(a) Strom-Spannungskurven repräsentativer wt und G93A hMN. Die Steigung der linearen Anpassung entspricht dem Eingangswiderstand und war nicht signifikant unterschiedlich. Auch die Kapazität unterschied sich nicht. (b) Spannungsantwort auf die Injektion eines hyperpolarisierenden Strompulses repräsentativer wt und G93A hMN ausgehend vom Ruhemembranpotential. Das Ruhemembranpotential war signifikant hyperpolarisierter in G93A hMN, die Amplitude des *sag* unterschied sich nicht. Student's t-Test: ** $p < 0.01$

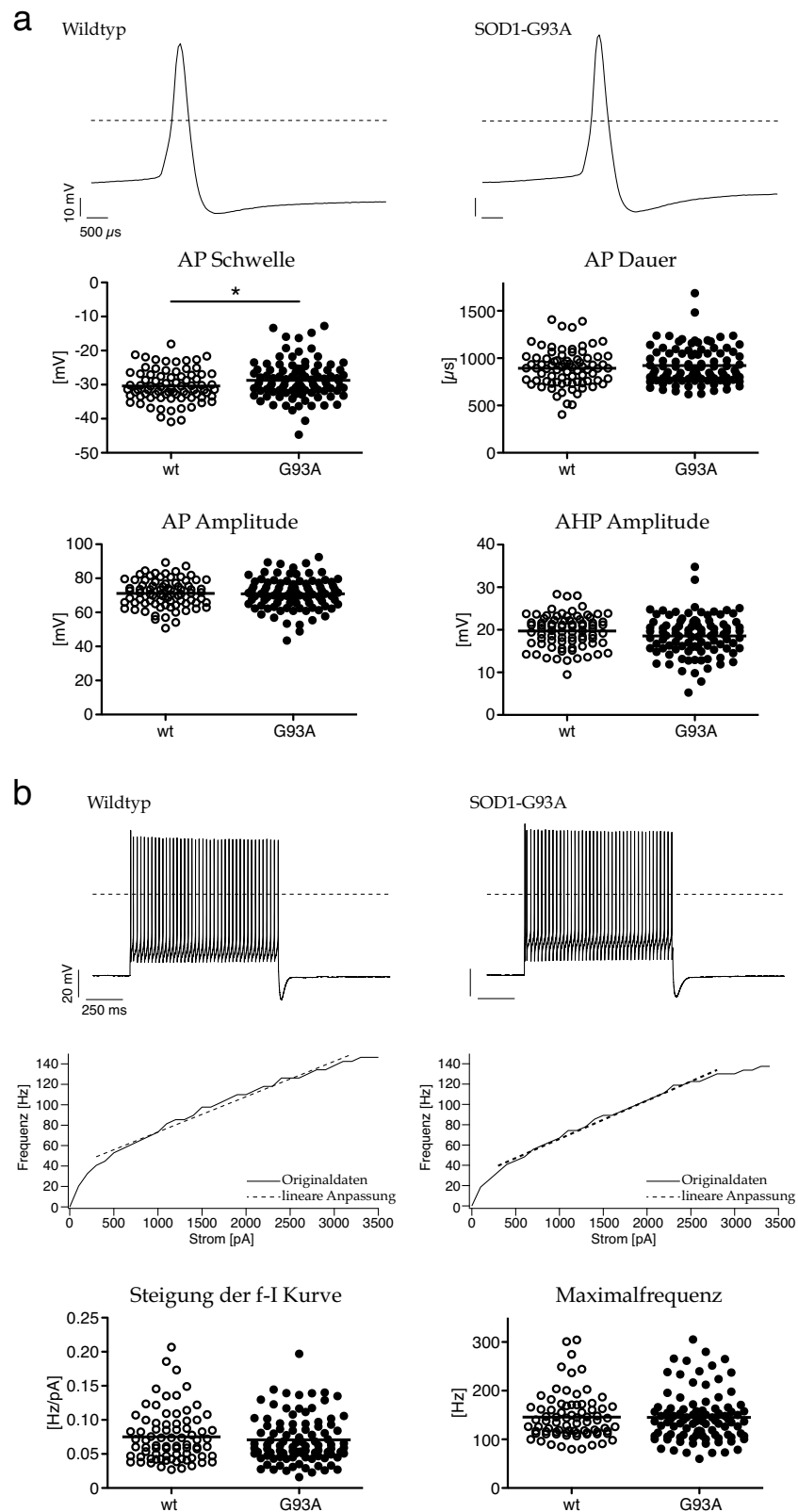


Abbildung 3.3: Aktive Eigenschaften von Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus

(a) Aktionspotentiale repräsentativer wt und G93A hMN. Bis auf die Schwelle unterschieden sich die Aktionspotentialformen nicht. (b) Spannungsantwort auf einen depolarisierenden Strompuls und Frequenz-Strom-Kurven repräsentativer wt und G93A hMN. f-I Steigung und Maximalfrequenz unterschieden sich nicht.

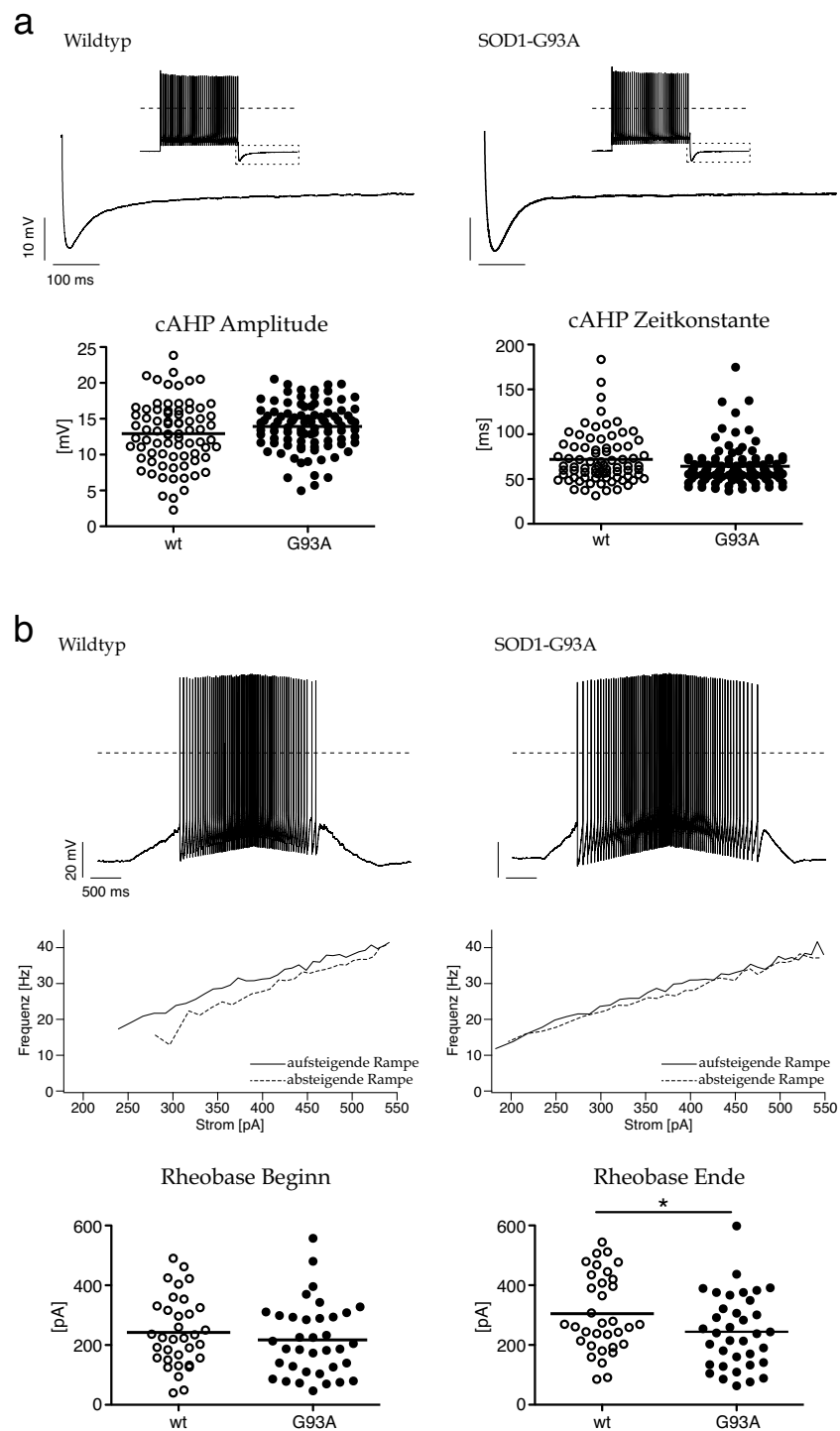


Abbildung 3.4: cAHP und Rheobase von Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus

(a) cAHP von repräsentativen wt und G93A hMN. Es bestand eine Tendenz zu größeren und schnelleren cAHP bei G93A. (b) Spannungsantwort auf eine rampenförmige Strominjektion und Frequenz-Strom Kurven der Rampe von repräsentativen wt und G93A hMN. Die Rheobase der G93A hMN war größer als die der wt hMN, signifikant bei der absteigenden Rampe. Student's t-Test * $p < 0.05$

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die elektrophysiologischen Charakteristika adulter hMN zwischen wt und G93A nicht wesentlich unterscheiden. Eine geringere Rheobase bei absteigender Rampe in den G93A Neuronen ist ein Indiz für eine stärkere Aktivierung persistierender depolarisierender Ströme während der aufsteigenden Rampe. Ein direkter Nachweis von persistierenden Einwärtsströmen wurde deshalb durchgeführt (siehe 3.1.1.2). Die tendenziellen Unterschiede im cAHP ließen die Vermutung aufkommen, dass sich die Calciumhomöostase in G93A hMN von der in wt hMN unterschied. Dieser Hinweis sollte mit der fluorometrischen Calciummessung überprüft werden (siehe 3.2.1.1).

Elektrophysiologische Daten aus den Stimulationsprotokollen für die fluorometrischen Messungen

Bei den fluorometrischen Messungen wurde eine andere Pipettenlösung verwendet (mit ATP und GTP, anderes Calciumpuffersystem: Fura-2 statt EGTA) und die Stimulationspause zwischen den Schritten der rechteckförmigen Strominjektion statt der 5 s auf 45 - 90 s verlängert. Diese veränderten Versuchsbedingungen führten zu Variationen einiger elektrophysiologischer Parameter. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt und in Abb. 3.7 visualisiert.

Die Zellen der fluorometrisch analysierten Stichprobe hatten eine signifikant größere Membrankapazität jedoch ohne Unterschied zwischen wt und G93A. Dauer und Amplitude des einzelnen Aktionspotentials bei 40 Hz blieben robust gegenüber den Veränderungen. Der Vergleich der f-I Steigungen lieferte zwar eine Signifikanz in der ANOVA, der Post-Hoc-Test zeigte jedoch nur einen signifikanten Unterschied zwischen den fluorometrischen Daten der wt hMN und den G93A Daten der reinen elektrophysiologischen Messung. Die Unterschiede zwischen wt und G93A im Ruhemembranpotential und dem Potential an der Aktionspotentialschwelle ließen sich mit der Stichprobe der fluorometrischen Messungen nicht reproduzieren. Neu war der signifikante Unterschied zwischen wt und G93A in der Amplitude des cAHP nach einem Strompuls, der eine Aktionspotentialfrequenz von 40 Hz hervorrief, mit etwa einem Drittel größeren Werten bei G93A. Vergleich man die Daten der reinen elektrophysiologischen Messungen mit denen der mit Fluorometrie kombinierten Messungen, waren bei letzterer der Parameter Ruhemembranpotential mit etwa 5 mV signifikant hyperpolarisierter und die Maximalfrequenz mit einem Unterschied von etwa 30% deutlich größer. Das Potential an der Aktionspotentialschwelle war auch mit 5 mV Unterschied signifikant depolarisierter bei der kombinierten Messung, die Amplitude des cAHP fast um die Hälfte kleiner und die Zeitkonstante des cAHP um ein Drittel größer. Alle anderen hier nicht aufgeführten Parameter wurden bei den fluorometrischen Messungen nicht erfasst.

Parameter	wt (n=24)	G93A (n=26)	ANOVA
Membrankapazität [pF]	63.82 ± 4.08	62.96 ± 3.95	**
Ruhepotential [mV]	-54.07 ± 0.90, n=19	-56.08 ± 0.90, n=24	***
Steigung f-I [Hz/pA]	0.096 ± 0.009	0.077 ± 0.007	*
Maximalfrequenz [Hz]	201.60 ± 14.19	198.30 ± 11.23	***
AP Schwelle [mV]	-26.71 ± 1.52	-23.27 ± 1.72	***
AP Dauer [μs]	930.78 ± 52.54	898.36 ± 37.07	
AP Amplitude [mV]	66.20 ± 2.17	66.64 ± 2.03	
AHP Amplitude [mV]	20.70 ± 0.73	21.90 ± 0.76	**
cAHP Amplitude [mV]	6.55 ± 0.51	9.71 ± 0.62	***
cAHP Zeitkonstante [ms]	102.90 ± 13.79	88.10 ± 12.67	***

Tabelle 3.2: Elektrophysiologische Daten aus Stimulationen der fluorometrischen Messungen bei hMN

ANOVA zum Vergleich der Daten aus fluorometrischen und rein elektrophysiologischen Messungen, sowie zwischen wt und G93A, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, Ergebnisse der Post-Hoc-Tests siehe Text, wt: N=7, G93A: N=5

3.1.1.2 Persistierende Einwärtsströme

Als eine Ursache der Übererregbarkeit juveniler G93A Motoneurone und somit als Grund für die Degeneration im Alter wurde ein stärkerer Strom durch persistierende Natriumkanäle diskutiert (siehe 1.3.1.3). Ein Hinweis auf Übererregbarkeit in adulten Tieren fehlt in den bisher dargestellten Daten, der Unterschied in der Rheobase könnte aber den Schluss zulassen, dass auch im Adulten erhöhte PIC in G93A MN vorhanden sind. Dieser Strom wurde daher analysiert, um seinen Einfluss zum Zeitpunkt des Zellsterbens abschätzen zu können.

Beispielhafte Stromkurven sind in Abb. 3.5a und b dargestellt, die Werte in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Parameter	wt (n=15)	G93A (n=24)	t-Test
Stromamplitude [pA]	-274.60 ± 37.32	-239.80 ± 29.72	p=0.4713
Stromdichte [pA/pF]	-4.59 ± 0.34	-4.26 ± 0.45	p=0.5979
Steigung Boltzmannkurve	5.85 ± 0.58	4.75 ± 0.33	p=0.0864
V ₅₀ [mV]	-37.48 ± 1.19	-37.74 ± 1.11	p=0.8801

Tabelle 3.3: Persistierende Einwärtsströme bei hMN

Student's t-Test zum Vergleich der Mittelwerte von wt und G93A, * p<0.05, ** p<0.01, wt: N=7, G93A: N=7

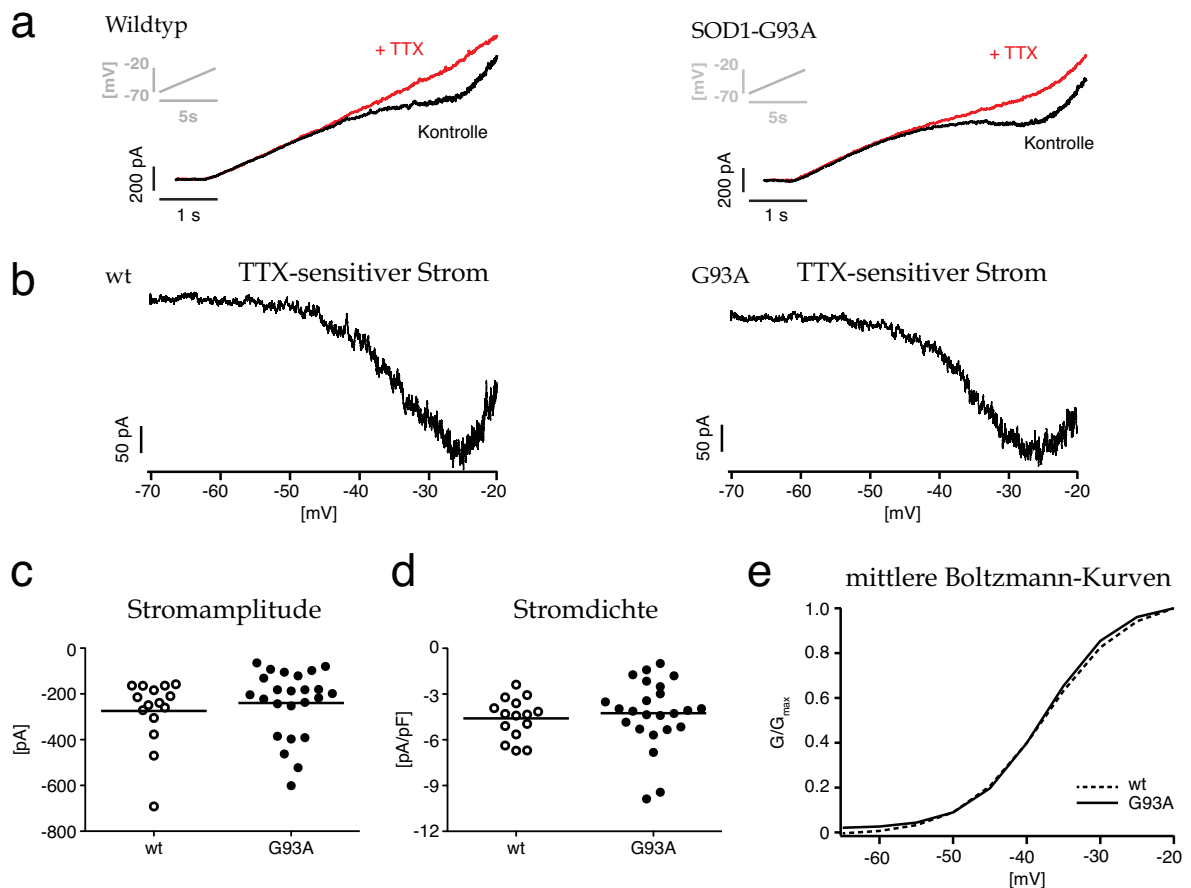


Abbildung 3.5: Persistierende Einwärtsströme in adulten hMN

Es besteht kein Unterschied im PIC zwischen G93A und wt hMN im Endstadium der Krankheit. (a) Repräsentative Stromantwort auf eine aufsteigende Spannungsrampe ohne (schwarz) und mit TTX (rot) von wt und G93A hMN. (b) TTX-sensitiver Strom nach Subtraktion der beiden Komponenten aus (a) von wt und G93A hMN. (c) Stromamplituden aller analysierten Zellen. Mittelwerte sind nicht signifikant unterschiedlich. (d) Stromamplituden normiert auf die Membrankapazität. Mittelwerte sind nicht signifikant unterschiedlich. (e) Mittlere normierte Leitfähigkeit-Spannungskurven nach sigmoidaler Anpassung mit einer Boltzmannkurve von wt und G93A hMN. Halbmaximale Kanalaktivierung und Spannungsabhängigkeit der Aktivierung sind nicht signifikant unterschiedlich.

Im Endstadium der Krankheit konnte kein Unterschied der Stromamplitude (siehe Abb. 3.5c) oder der Stromdichte (siehe Abb. 3.5d) persistierender TTX-sensitiver Natrium-Einwärtsströme zwischen G93A hMN und wt hMN gleichen Alters festgestellt werden. Auch die Spannungsabhängigkeit der Kanalöffnung (Steigung der Boltzmann-Kurve) oder das Membranpotential bei halbmaximaler Leitfähigkeit (V_{50}) waren nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abb. 3.5e). Ein direkter Einfluss persistierender Natriumströme auf die Neurodegeneration in diesem ALS-Mausmodell ist somit unwahrscheinlich.

3.1.2 Charakterisierung der Motoneurone des Ncl. Oculomotorius

Motoneurone des Ncl. Oculomotorius (oMN) wurden nach ihrer Größe und der Lage im Kern ausgewählt. Alle oMN wurden zur anschließenden Identifikation während der Messung mit Neurobiotin gefüllt und ihre Identität mit dem Motoneuronmarker Cholin-Acetyltransferase (ChAT) histologisch überprüft (siehe Abb. 3.6).

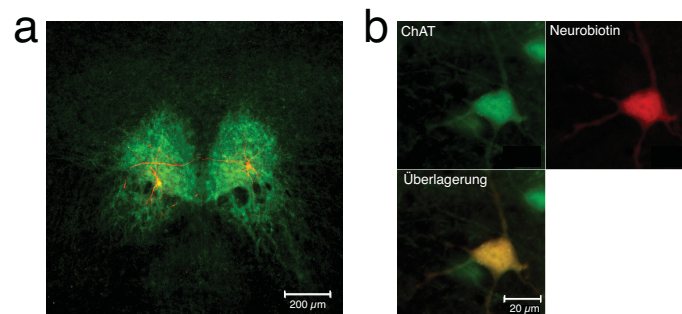


Abbildung 3.6: Identifikation gemessener oMN

(a) ChAT-Färbung (grün) eines Hirnschnittes mit zwei gemessenen Zellen (gefüllt mit Neurobiotin, rot) im Ncl. Oculomotorius zum Nachweis der Lage im Kern. (b) ChAT-Färbung (grün) eines gemessenen Neurons (gefüllt mit Neurobiotin, rot) im Ncl. Oculomotorius zum Nachweis der Motoneuronidentität.

Vergleich elektrophysiologischer Eigenschaften adulter Motoneurone des Ncl. Oculomotorius von Wildtyp- und SOD1-G93A-Mäusen

Alle Daten (siehe Tabelle 3.4, Abb. 3.7) stammten aus den Stimulationsprotokollen für die fluorometrische Messung der Calciumkonzentration. Die Membrankapazität und das Ruhemembranpotential waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen wt und G93A oMN. Der einzige signifikant unterschiedliche Parameter war die Steigung der Frequenz-Strom-Kurve. Hier wiesen die wt oMN eine größere Erregbarkeit auf. Kein Unterschied ließ sich in der Maximalfrequenz feststellen. Nicht signifikante Tendenzen zu höheren Werten in wt oMN zeigten sich bei der Amplitude und der AHP Amplitude des einzelnen Aktionspotentials bei 40 Hz. Die Dauer und das Potential an der Schwelle glichen sich. Auch die beschreibenden Parameter des cAHP zeigten keine signifikanten Unterschiede. Bis auf den Unterschied in der Erregbarkeit gibt es also keinen Unterschied in den elektrophysiologischen Eigenschaften zwischen wt und G93A in Motoneuronen des Ncl. Oculomotorius.

3.1.3 Vergleich der Eigenschaften vulnerabler Motoneurone des Ncl. Hypoglossus und resistenter Motoneurone des Ncl. Oculomotorius

Zur Erklärungsfindung differentieller Vulnerabilität verschiedener Motoneuronpopulationen bei der ALS wurden zusätzlich die elektrophysiologischen Charakteristika von Motoneuronen des vulnerablen Ncl. Hypoglossus mit denen des resistenten Ncl. Oculomotorius verglichen. Da die Daten der oMN nur aus den fluorometrischen Messungen vorlagen,

Parameter	wt (n=25)	G93A (n=26)	t-Test
Membrankapazität [pF]	56.26 \pm 3.66	55.77 \pm 2.93	p=0.9175
Ruhepotential [mV]	-58.00 \pm 0.85 n=22	-58.62 \pm 0.95 n=22	p=0.6311
Steigung f-I [Hz/pA]	0.134 \pm 0.011	0.103 \pm 0.009	p=0.0268*
Maximalfrequenz [Hz]	285.00 \pm 9.19	288.30 \pm 9.35	p=0.8020
AP Schwelle [mV]	-31.98 \pm 0.89	-32.25 \pm 0.99	p=0.8395
AP Dauer [μ s]	937.60 \pm 46.58	909.00 \pm 42.56	p=0.6513
AP Amplitude [mV]	79.38 \pm 0.66	76.39 \pm 1.43	p=0.0652
AHP Amplitude [mV]	21.91 \pm 0.63	20.06 \pm 0.72	p=0.0601
cAHP Amplitude [mV]	4.90 \pm 0.60	5.91 \pm 0.41	p=0.1654
cAHP Zeitkonstante [ms]	161.60 \pm 20.61	142.10 \pm 15.30	p=0.4428

Tabelle 3.4: Elektrophysiologische Daten aus Stimulationen der fluorometrischen Messungen bei oMN

Student's t-Test zum Vergleich der Mittelwerte von wt und G93A, wt: N=7, G93A: N=5

wurden diese den entsprechenden Daten aus den fluorometrischen Messungen von hMN gegenübergestellt. Die Vergleiche sind in Abb. 3.7 dargestellt. Es zeigten sich in vielen Parametern deutliche Unterschiede zwischen dem vulnerablen und dem resistenten Kern. So war die Maximalfrequenz in oMN um 40% höher als in hMN, unabhängig vom Genotyp. Das Membranpotential an der Aktionspotentialschwelle war genotypunabhängig hyperpolarisierter, die Aktionspotentialamplitude um etwa 20% größer in oMN. Bei den Parametern Membrankapazität, Aktionspotentialdauer und Amplitude der Nachhyperpolarisation ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen hMN und oMN feststellen. Das Ruhemembranpotential war geringfügig hyperpolarisierter in oMN, signifikant bei wt Zellen. Die oMN waren generell erregbarer als hMN, auch hier wieder signifikant bei wt Zellen. Bei der cAHP Zeitkonstante traten nur nicht signifikante Tendenzen zu einem größeren Wert bei wt und G93A oMN im Vergleich zu hMN auf. Der signifikante Unterschied zwischen wt und G93A hMN bei der cAHP Amplitude zeigte sich bei oMN nicht. G93A oMN hatten nur eine etwa halb so große cAHP Amplitude wie G93A hMN, die wt Neurone unterschieden sich nicht. Der Hinweis auf eine gestörte Calciumhomöostase wegen eines veränderten cAHP bei G93A hMN war somit bei oMN nicht vorhanden.

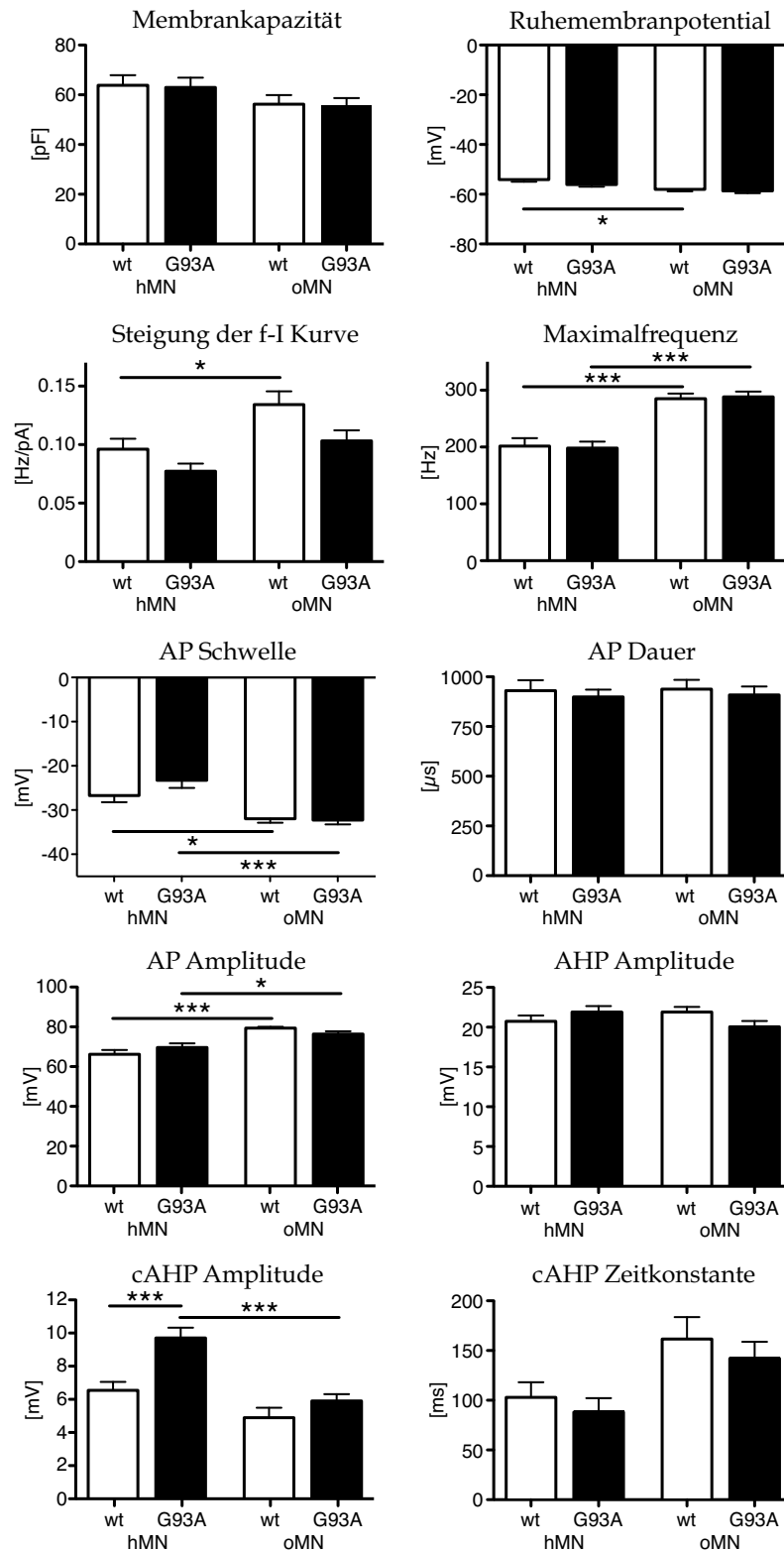


Abbildung 3.7: Vergleich elektrophysiologischer Charakteristika zwischen hMN und oMN
 Vulnerable hMN und resistente oMN unterschieden sich in einigen Parametern, wie der Maximalfrequenz und der AP Schwelle und Amplitude. Der Unterschied in der cAHP Amplitude bei hMN zeigte sich bei oMN nicht. Tukey Post-Hoc-Test nach ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.2 Fluorometrische Messungen der Calciumkonzentration und des mitochondrialen Membranpotentials

Calciumüberladung und Exzitotoxizität werden als Ursachen der Motoneurondegeneration bei ALS angenommen (siehe 1.2.3.2). Erste Hinweise dazu ergaben sich auch schon aus den gezeigten elektrophysiologischen Messungen. Mit fluorometrischen Messungen des Calcium-Indikatorfarbstoffs Fura-2 konnte in der vorliegenden Arbeit die Calciumkonzentration und die Calciumkinetiken adulter Motoneurone im Mausmodell nach Stimulation abgeschätzt werden. Auch mit dieser Methode gelang ein Vergleich zwischen Wildtyp und SOD1-G93A, sowie zwischen vulnerablen und resistenten Motoneuron-Populationen. Ein weiterer, damit in Verbindung stehender, potentieller Pathomechanismus ist die Schädigung von Mitochondrien, die in verringerter Calciumspeicherung und Einleitung von Apoptose mündet. Den Anteil der Mitochondrien an der Calciumhomöostase von Motoneuronen und die eventuellen Unterschiede zwischen wt und G93A wurden mittels fluorometrischer Calciummessung in Kombination mit Organellen- und Transporter-spezifischer Pharmakologie getestet. Die Triebkraft der Calciumaufnahme und ein Maß für die Intaktheit stellt das mitochondriale Membranpotential dar, das mittels fluorometrischer Messung von Rhodamine123 abgeschätzt werden konnte.

3.2.1 Fluorometrische Analyse der Motoneurone des Ncl. Hypoglossus

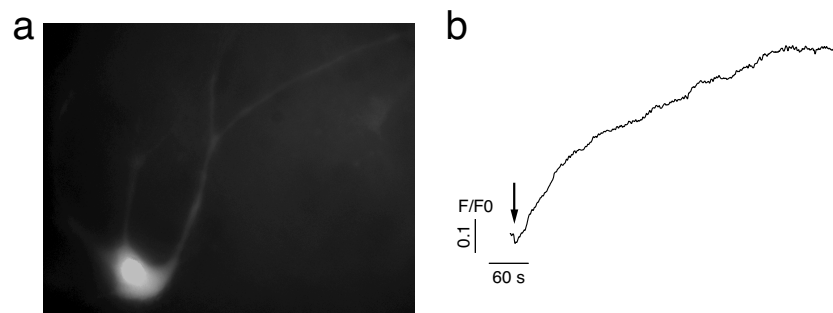


Abbildung 3.8: Füllung eines Motoneurons mit Fura-2

(a) Eine in der *Whole-Cell*-Konfiguration mit Fura-2 gefüllte Zelle, mit Licht von 380 nm Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt. (b) Fluoreszenzsignal nach 380 nm Anregung während der Füllung eines hMN. Pfeil: Öffnung der Zelle.

Wie bei den rein elektrophysiologischen Messungen wurden auch bei den fluorometrischen Registrierungen Motoneurone des Ncl. Hypoglossus im ventralen Teil des Kerns nach Größe ausgewählt. Der Calciumindikator Fura-2 gelangte nach Erreichen der *Whole-Cell*-Konfiguration durch Diffusion in die Zellen (siehe Abb. 3.8). Die Stimulationen und die Registrierung der Fluoreszenzintensität wurden nach Erreichen des Diffusionsgleichgewichts durchgeführt. Bei allen Fura-2-Fluoreszenzmessungen wurden die Zellen durch

rechteckige Strompulse depolarisiert und die entsprechende Calciumbeladung bei verschiedenen Aktionspotentialfrequenzen registriert. Verglichen wurde die Amplitude des Signals, die auf die Amplitude normierte Fläche und, wenn möglich, die Zeitkonstante des Abfalls nach Anpassung einer monoexponentiellen Kurve bei den Stimulationsschritten, die eine Aktionspotentialfrequenz von 40 Hz oder Maximalfrequenz bedingten.

3.2.1.1 Analyse der Calciumsignale

In Abb. 3.9 sind repräsentative Fluoreszenzkurven (3.9b) während repetitiver elektrischer Stimulation (3.9a) von wt und G93A hMN, sowie die Amplitude-Frequenz- (3.9c), Zeitkonstante-Frequenz- (3.9d) und Fläche-Frequenz-Kurven (3.9e) dargestellt. Bei Beginn der Aktionspotentialgenerierung stieg das Fluoreszenzsignal als Maß für Calciuminflux an, ab Ende der Stimulation fiel die Kurve wieder ab, was einem Transport von Calcium in intrazelluläre Speicher oder aus der Zelle heraus entsprach. Proportional zum Frequenzanstieg der Aktionspotentiale erhöhte sich die Amplitude und die Fläche des Signals. Der Abfall ließ sich gut monoexponentiell anpassen und die Zeit, bei der die Kurve auf $1/e \approx 37\%$ des Maximums abgefallen war, wurde als Zeitkonstante τ bestimmt.

In Abb. 3.10 werden die Werte aller Zellen mit statistischer Auswertung gezeigt. Bei einer Entladungsfrequenz von 40 Hz ließ sich kein Unterschied in der Zeitkonstante (3.10b), wohl aber eine höhere Amplitude (3.10a) bei G93A hMN im Vergleich zu wt hMN feststellen. Bei Maximalfrequenz war der Amplitudenunterschied nicht signifikant, etwa ein Drittel der gemessenen Zellen aus G93A Tieren zeigten aber eine extrem verlangsamte Erholung des Calciumsignals (3.10b), was sich statistisch belegen ließ. Auch die Fläche des Calciumsignals war mit einem 30%igen Unterschied signifikant größer in G93A hMN bei maximaler Aktionspotentialfrequenz (3.10c). G93A hMN zeigten somit bei hoher Calciumbelastung ein Defizit in der Erholungsgeschwindigkeit, das bei niedrigen Calciumbelastungen und wt hMN nicht auftrat. (Werte siehe Tabelle 3.5)

Parameter	wt (n=24)	G93A (n=26)	t-Test
Amplitude 40 Hz [F/F ₀]	0.109 ± 0.018	0.166 ± 0.020	p=0.0352*
Amplitude max [F/F ₀]	0.286 ± 0.054	0.421 ± 0.058	p=0.0965
Zeitkonstante 40 Hz [s]	2.80 ± 0.31	2.99 ± 0.21	p=0.6026
Zeitkonstante max [s]	7.71 ± 0.71	11.96 ± 1.66	p=0.0230*
Fläche 40 Hz	4130 ± 415	4365 ± 307	p=0.6512
Fläche max	8816 ± 833	12742 ± 1687	p=0.0444*

Tabelle 3.5: Calciumsignale der Motoneurone des Ncl. Hypoglossus: Student's t-Test zum Vergleich der Mittelwerte von wt und G93A, * p<0.05, wt: N=7, tg: N=5, 40 Hz: Parameter bei 40 Hz Aktionspotentialfrequenz, max: Parameter bei maximaler Aktionspotentialfrequenz

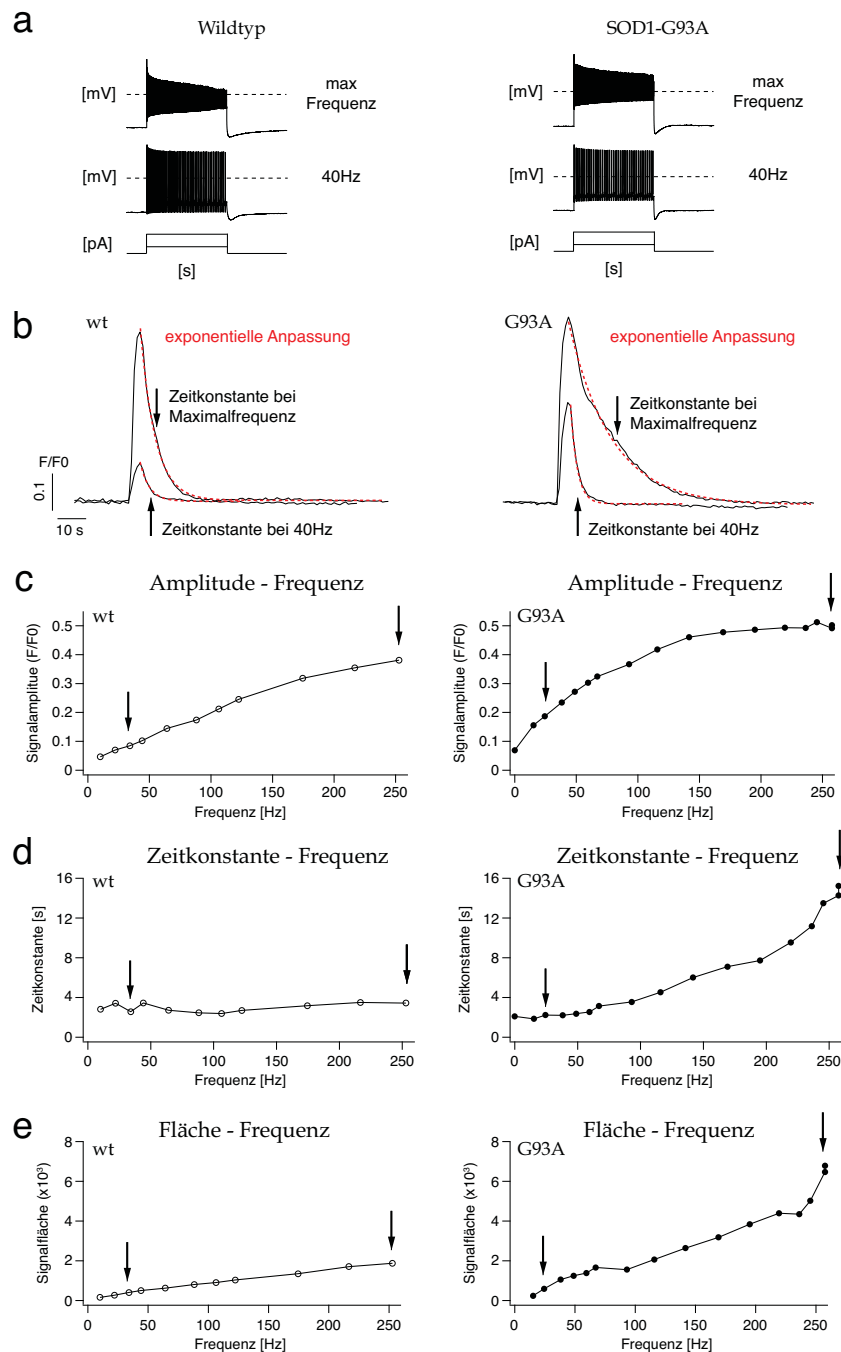


Abbildung 3.9: Fura-2-Fluoreszenzsignale während elektrischer Stimulation von hMN

Beispiele repräsentativer wt und G93A hMN (a) Stimulationsprotokoll. Auf Injektion von rechteckförmigen Strompulsen steigender Stärke generieren die Zellen Aktionspotentialsalven steigender Frequenz. Dargestellt sind die Beispiele einer 40 Hz-Stimulation und einer Stimulation für Maximalfrequenz. (b) Ratiometrisches Fura-2-Fluoreszenzsignal nach der Stimulation mit 40 Hz und Maximalfrequenz. Aus der Kurve der exponentiellen Anpassung ergibt sich die Zeitkonstante. (c) Aufgetragen ist die Fura-2-Signalamplitude gegen die Aktionspotentialfrequenz bei den verschiedenen Stimulationsschritten. (d) Aufgetragen ist die Zeitkonstante der exponentiellen Anpassung gegen die Aktionspotentialfrequenz bei den verschiedenen Stimulationsschritten. (e) Aufgetragen ist die Fura-2-Signalfäche gegen die Aktionspotentialfrequenz bei den verschiedenen Stimulationsschritten. Die Pfeile zeigen auf die Stimulationsschritte für 40 Hz und Maximalfrequenz.

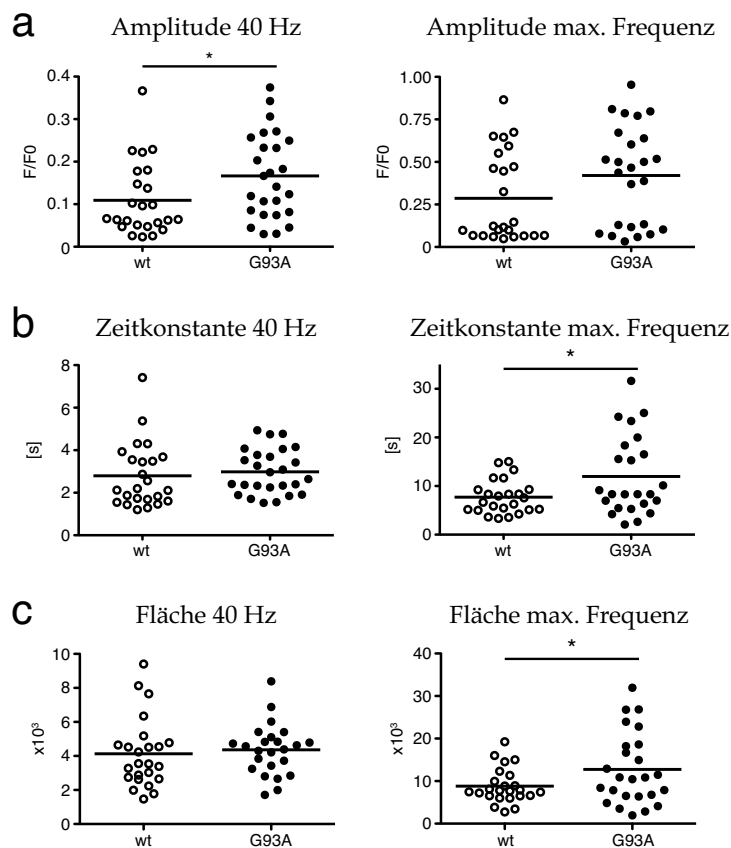


Abbildung 3.10: Calciumsignale der Motoneurone des Ncl. Hypoglossus

Bei hoher Calciumbelastung wird die Erholung des Calciumsignals bei G93A hMN signifikant langsamer. (a) Signalamplituden (b) Zeitkonstanten nach exponentieller Anpassung der Signalkurven (c) normierte Flächen der Kurven, Student's t-Test * $p < 0.05$

3.2.1.2 Calciumtransport in die Mitochondrien

Die Erholung des Calciumsignals erfolgt durch Transport über die Plasmamembran in den Extrazellulärraum, in das Endoplasmatische Retikulum und in Mitochondrien. Da eine Schädigung von Mitochondrien bei ALS bereits mittels histologischer und biochemischer Befunde postuliert ist (siehe 1.2.3.2), wurde nun zuerst die Calciumaufnahme in Mitochondrien untersucht, um den pathologischen Befund der fluorometrischen Calciummessungen zu ergründen. Dies wurde mittels spezifischer Pharmakologie erreicht.

Entkopplung der Mitochondrien

FCCP ist eine ionophore Substanz, die spezifisch in Mitochondrien den Protonengradienten zerstört, indem es sich in die Mitochondrienmembran einlagert und einen Protonentransport erleichtert [Benz and McLaughlin, 1983]. Bei Kontakt einer Zelle mit FCCP verringert sich somit das mitochondriale Membranpotential und die Triebkraft für eine Calciumaufnahme sinkt. Nach Präinkubation der Hirnschnitte in 200 nM FCCP-haltiger

Badlösung wurden Motoneurone wie unter 3.2.1.1 elektrisch stimuliert und die Fura-2-Signale aufgezeichnet (siehe Abb. 3.11a). Generell ließ sich ein nicht signifikanter Anstieg der Signalamplitude beobachten (siehe Abb. 3.11b). Der Post-Hoc-Test nach signifikanter ANOVA zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Zeitkonstante des Abfalls und normierte Fläche des Signals vergrößerten sich signifikant auf mehr als das Doppelte bei wt hMN sowohl bei 40 Hz als auch bei Maximalfrequenz (siehe Abb. 3.11c,d). Im Vergleich zu den Messungen ohne FCCP veränderten sich jedoch Zeitkonstante und Fläche bei G93A hMN kaum bei beiden Messzeitpunkten. Der Unterschied bei 40 Hz zwischen wt und G93A hMN mit FCCP war signifikant. Bei Maximalfrequenz glichen sich mit FCCP die Werte von Fläche und Zeitkonstante der wt hMN denen von G93A hMN an. (Werte siehe Tabelle 3.6)

Mehr als 50% des zytosolischen Calciums nach elektrischer Stimulation wurde somit bei wt hMN in Mitochondrien transportiert. Neurone der G93A Tiere zeigten keine veränderte Reaktion auf Calciumbeladung, wenn Mitochondrien entkoppelt wurden.

Parameter	wt (n=22)	G93A (n=22)	ANOVA
Amplitude 40 Hz [F/F0]	0.171 ± 0.014	0.171 ± 0.020	*
Amplitude max [F/F0]	0.452 ± 0.038	0.521 ± 0.049	
Zeitkonstante 40 Hz [s]	5.09 ± 0.73	3.16 ± 0.26	***
Zeitkonstante max [s]	17.03 ± 2.69	14.82 ± 2.61	*
Fläche 40 Hz	6502 ± 677	4685 ± 262	***
Fläche max	14519 ± 1596	14758 ± 2501	

Tabelle 3.6: Mitochondriale Entkopplung der Motoneurone des Ncl. Hypoglossus

ANOVA zum Vergleich der Daten aus den Kontrollmessungen ohne Entkoppler und denen mit 200 nM FCCP, sowie zwischen wt und G93A, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Ergebnisse der Post-Hoc-Tests siehe Abb. 3.11, wt: N=5, G93A: N=7

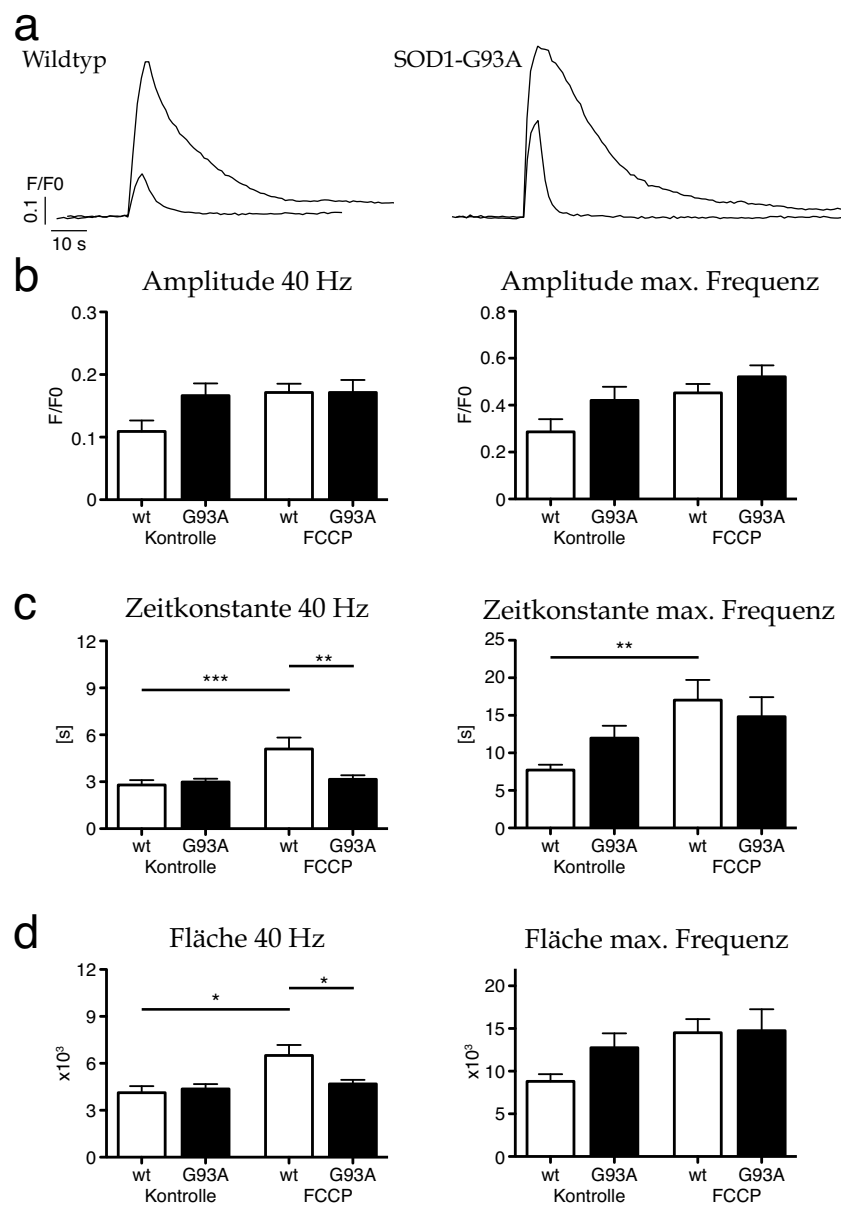


Abbildung 3.11: Mitochondriale Entkopplung der Motoneurone des Ncl. Hypoglossus

Vergleich der Daten aus den Kontrollmessungen ohne Entkoppler mit denen mit 200 nM FCCP. G93A hMN Calciumsignale verändern sich kaum bei mitochondrialer Entkopplung. **(a)** Repräsentative Fura-2-Fluoreszenzkurven nach Stimulationen zu 40 Hz und Maximalfrequenz von wt und G93A hMN. **(b)** Signalamplituden ändern sich kaum. **(c)** Zeitkonstanten nach exponentieller Anpassung der Signalkurven werden nur bei wt hMN größer. **(d)** Normierte Flächen der Kurven werden nur bei wt hMN größer. Tukey Post-Hoc-Test nach ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Blockade des mitochondrialen Calciumuniporters

Die Aufnahme von Calcium in die Mitochondrien wird bestimmt durch die Transportkapazität und die Triebkraft. Die Verringerung einer der beiden oder beider Faktoren zusammen sollte der gezeigten reduzierten Calciumaufnahme in Mitochondrien der G93A hMN unterliegen.

Der Calciumuniporter ist der wichtigste Transporter für Calcium in die Mitochondrien-Matrix (siehe 1.3.2.2). Zur Untersuchung dessen Transportkapazität wurde eine spezifische pharmakologische Blockade mit $20 \mu\text{M}$ Ru360 durchgeführt und wiederum die Fura-2-Fluoreszenz bei elektrischer Stimulation aufgezeichnet. Bei etwa 70% der analysierten Neurone, unabhängig vom Genotyp, bildete sich bei höherer Calciumbelastung ein Plateau des Signals bei maximalem Fluoreszenzwert aus (siehe Abb. 3.12a). Dies machte die Anpassung einer Exponentialkurve zur Beschreibung unmöglich, ausgewertet wurde daher nur die Amplitude und die normierte Fläche. Die Amplitude des Fluoreszenzsignals vergrößerte sich um etwa das Zweifache, wenn dieser Transport blockiert wurde, signifikant sowohl bei wt als auch bei G93A bei Maximalfrequenz, bei 40 Hz nur signifikant bei wt hMN (siehe Abb. 3.12b). Ein Ru360-abhängiger Effekt ließ sich bei der 40 Hz Signalfäche nicht beobachten. Allerdings glich sich wie mit der Entkopplung durch FCCP auch mit Ru360-abhängiger Blockade des Calciumuniporters die Fläche des Signals bei Maximalfrequenz von wt hMN denen von G93A hMN an, so dass sich die Fläche der Calciumsignale von wt Zellen ohne Blockade zu der Fläche mit Blockade um 85% signifikant vergrößerte (siehe Abb. 3.12c). Die Signalfäche der G93A Zellen vergrößerte sich bei Maximalfrequenz nur leicht um 30%. (Werte siehe Tabelle 3.7)

Der Effekt von FCCP auf die Calciumkinetiken der Motoneurone konnte also mit Ru360 nachgestellt werden. Wieder wurden die wt hMN in ihrer Calciumspeicherung stark behindert und die G93A hMN durch Blockade dieses Weges kaum beeinflusst. Eine verringerte Transportkapazität des Calciumuniporters als Ursache der verlangsamten Erholung des Calciumsignals bei G93A wäre bei gleicher Triebkraft wahrscheinlich. Eine verringerte Triebkraft könnte diese Ergebnisse allerdings auch erklären.

Parameter	wt (n=25)	G93A (n=25)	ANOVA
Amplitude 40 Hz [F/F0]	0.219 ± 0.013	0.224 ± 0.014	***
Amplitude max [F/F0]	0.666 ± 0.031	0.701 ± 0.048	***
Fläche 40 Hz	4698 ± 468	5721 ± 467	*
Fläche max	16281 ± 1198	16630 ± 1868	***

Tabelle 3.7: Blockade des mitochondrialen Calciumuniporters in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus

ANOVA zum Vergleich der Daten aus den Kontrollmessungen ohne Blockade und denen mit $20 \mu\text{M}$ Ru360, sowie zwischen wt und G93A, *** $p < 0.001$, Ergebnisse der Post-Hoc-Tests siehe Abb. 3.12, wt: N=4, G93A: N=5

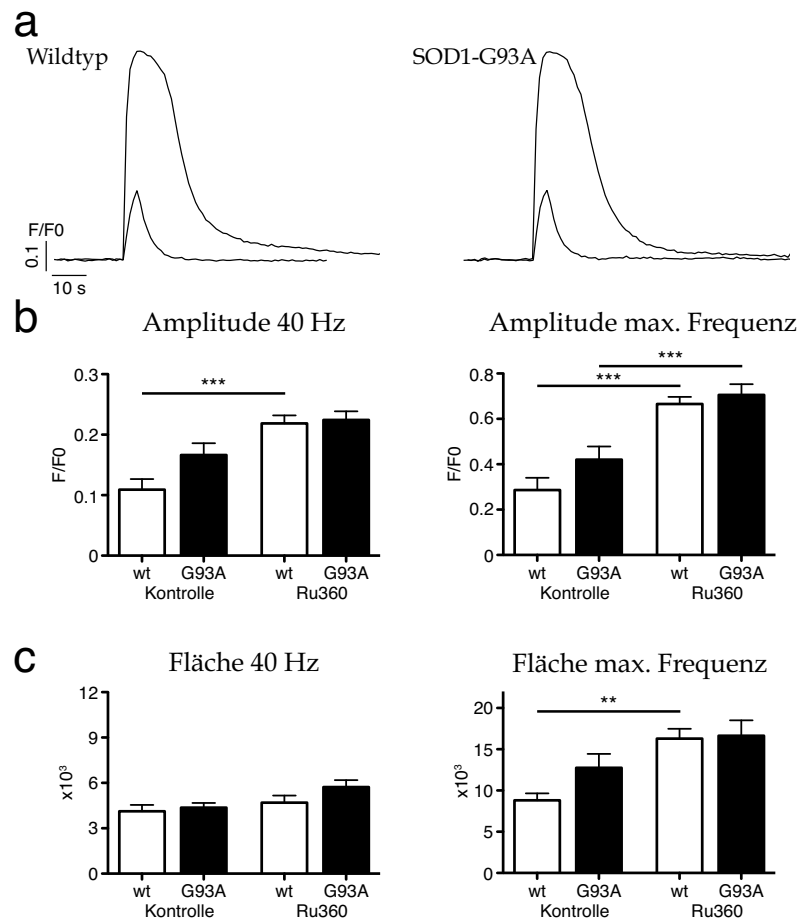


Abbildung 3.12: Blockade des mitochondrialen Calciumuniporters in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus

Vergleich der Daten aus den Kontrollmessungen ohne Blockade mit denen mit 20 μM Ru360. Calciumkinetiken von wt hMN glichen sich an die sich kaum verändernden Werte von G93A hMN an. **(a)** Repräsentative Fura-2-Fluoreszenzkurven nach 40 Hz und Maximalfrequenz von wt und G93A hMN. Es bildet sich ein Plateau zu Beginn der Erholungsphase bei hoher Calciumbelastung. **(b)** Signalamplituden werden bei beiden Genotypen größer. **(c)** Normierte Flächen der Kurven werden nur bei Maximalfrequenz bei wt hMN signifikant größer. Tukey Post-Hoc-Test nach ANOVA: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Blockade des mitochondrialen Natrium-Calcium-Austauschers

Die Transportrichtung des mitochondrialen Natrium-Calcium-Austauschers ist abhängig von dem Natrium- und Calciumgradienten zwischen Zytoplasma und Mitochondrienmatrix, der Transporter wird aber in der Regel als Hauptweg für Calcium aus dem Mitochondrium heraus im ER-Mitochondrien-Cyclus gesehen (siehe 1.3.2.2). Er lässt sich spezifisch durch 15 μM CGP37157 blockieren. Bei Anwendung dieser Blockade zusammen mit der elektrischen Stimulation und der Messung des fluorometrischen Calciumsignals konnte bei etwa 80% der Zellen eine Verlangsamung vor allem der späten Phase des Fluoreszenzsignals und somit der Erholung des Calciumsignals beobachtet werden (siehe Abb. 3.13a). Auch diese Veränderung verhinderte die Auswertung der Zeitkonstante.

Parameter	wt (n=24)	G93A (n=25)	ANOVA
Amplitude 40 Hz [F/F ₀]	0.172 ± 0.019	0.241 ± 0.018	***
Amplitude max [F/F ₀]	0.482 ± 0.035	0.635 ± 0.049	***
Fläche 40 Hz	4331 ± 196	5283 ± 509	
Fläche max	9707 ± 884	12333 ± 877	*

Tabelle 3.8: Blockade des mitochondrialen Natrium-Calcium-Austauschers in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus

ANOVA zum Vergleich der Daten aus den Kontrollmessungen ohne Blockade und denen mit 15 μ M CGP37157, sowie zwischen wt und G93A, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Ergebnisse der Post-Hoc-Tests siehe Abb. 3.13, wt: N=4, G93A: N=4

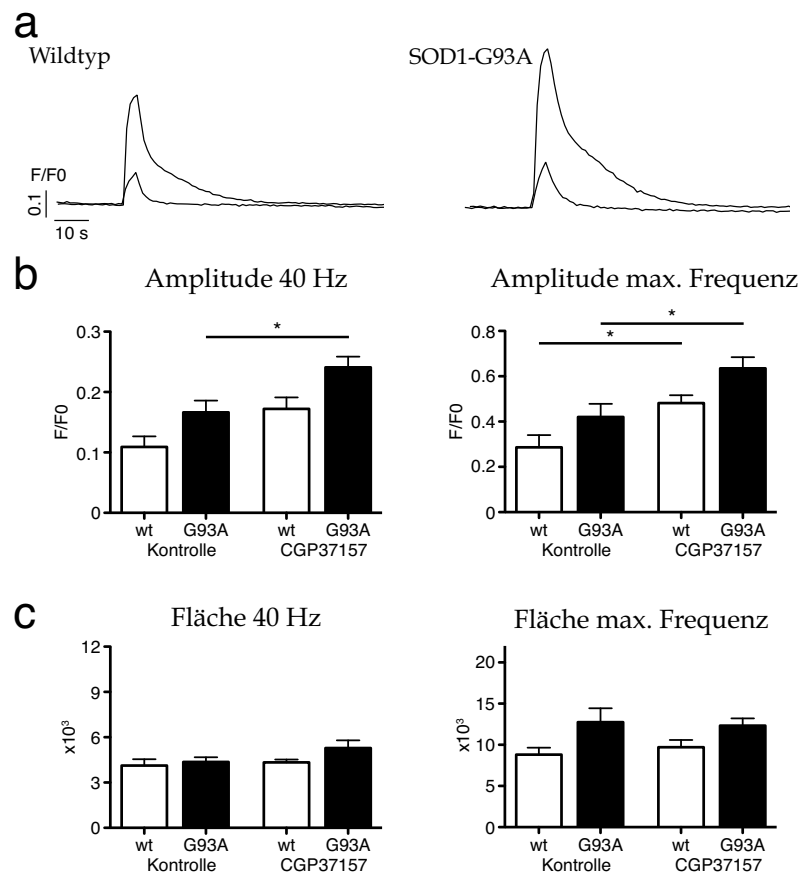


Abbildung 3.13: Blockade des mitochondrialen Natrium-Calcium-Austauschers in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus

Vergleich der Daten aus den Kontrollmessungen ohne Blockade mit denen mit 15 μ M CGP37157. Die Unterschiede zwischen den wt und G93A hMN Calciumkinetiken bleiben bestehen. **(a)** Repräsentative Fura-2-Fluoreszenzkurven nach 40 Hz und Maximalfrequenz von wt und G93A hMN. Die Kurve der Signalerholung flacht bei hoher Calciumbelastung ab. **(b)** Signalamplituden werden signifikant größer. **(c)** Normierte Flächen der Kurven ändern sich nicht. Tukey Post-Hoc-Test nach ANOVA: * $p < 0.05$

Die Amplitude wurde wie bei den anderen Modifikationen signifikant größer im Vergleich zu den Messungen ohne Blockade. Die normierte Fläche unter den Kurven änderte sich kaum durch die Blockade des Natrium-Calcium-Austauschers, weder bei 40 Hz noch bei Maximalfrequenz (siehe Abb. 3.13c). Der Unterschied zwischen wt und G93A bei Maximalfrequenz war weiterhin sichtbar, der Post-Hoc-Test ergab trotz signifikanter ANOVA bei Maximalfrequenz aber keine Unterschiede. (Werte siehe Tabelle 3.8)

Aus der veränderten Form der Fluoreszenzkurven lässt sich schließen, dass der mitochondriale Natrium-Calcium-Austauscher eine Rolle bei der Erholung des Calciumsignals in hMN spielt, unabhängig jedoch vom Krankheitsstatus der Zellen und ohne große Auswirkung auf die Calciumbelastung der Zelle.

Blockade der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore

Die mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore (mPTP) öffnet bei Calciumüberladung der Mitochondrien, was zur Apoptoseinduktion führt. Ob die mPTP auch physiologische Aufgaben hat, ist bisher unbekannt. Auch die Öffnung der mPTP bei ALS ist umstritten (siehe 1.3.2.2). Eine Öffnung würde die Neurodegeneration der ALS aufgrund von Calciumüberladung erklären. Auch die gezeigte langsame Erholung des Calciumsignals bei G93A hMN lässt sich mit einer Öffnung der mPTP erklären. Wäre die Calciumkonzentration in den Mitochondrien so hoch, dass die mPTP öffnet, würde die zytosolische Calciumkonzentration steigen und der Transport von Calcium aus dem Zytosol verlangsamt werden. Ob die mPTP bei der hier angewandten Stimulation öffnet, sollte durch die Blockade der Öffnung mit 2 μ M Cyclosporin A (CsA) geklärt werden. Die Erholung würde dann schneller ablaufen, die Fluoreszenzamplituden und die Flächen wären kleiner. Wenn die mPTP nicht öffnet, dürfte mit CsA keine Veränderung beobachtbar sein.

Die Auswertung der Fluoreszenzsignal-Amplitude nach elektrischer Stimulation ergab einen signifikanten Anstieg um 50-100% (siehe Abb. 3.14b). Die normierte Fläche bei 40 Hz zeigte keine signifikanten Unterschiede, bei Maximalfrequenz jedoch war die Fläche bei wt hMN fast doppelt so groß und damit signifikant größer als ohne Blocker, sowie signifikant unterschiedlich zu den Daten aus G93A Zellen, die eine tendenzielle Abnahme der Fläche zeigten (siehe Abb. 3.13c). (Werte siehe Tabelle 3.9). Eine spezifische Wirkung von CsA auf die mPTP-Öffnung ist somit fraglich.

3.2.1.3 Abschätzung des mitochondrialen Membranpotentials

Die fluorometrischen Calciummessungen ergaben bisher einen Hinweis auf verlangsamte Erholung des Calciumsignals in G93A hMN von Tieren im Krankheitsendstadium, bedingt durch eine Verringerung der mitochondrialen Calciumaufnahme. Eine verringerte Transportkapazität des mitochondrialen Uniporters ist möglich. Das mitochondriale Membranpotential als Triebkraft der Calciumaufnahme sollte nun noch registriert werden.

Parameter	wt (n=25)	G93A (n=24)	ANOVA
Amplitude 40 Hz [F/F ₀]	0.224 ± 0.013	0.232 ± 0.018	***
Amplitude max [F/F ₀]	0.589 ± 0.044	0.637 ± 0.050	***
Fläche 40 Hz	4591 ± 179	4129 ± 160	
Fläche max	16404 ± 1433	10623 ± 966	***

Tabelle 3.9: Blockade der mPTP-Öffnung in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus

ANOVA zum Vergleich der Daten aus den Kontrollmessungen ohne Blockade und denen mit 2 μ M Cyclosporin A, sowie zwischen wt und G93A, *** $p < 0.001$, Ergebnisse der Post-Hoc-Tests siehe Abb. 3.14, wt: N=5, G93A: N=4

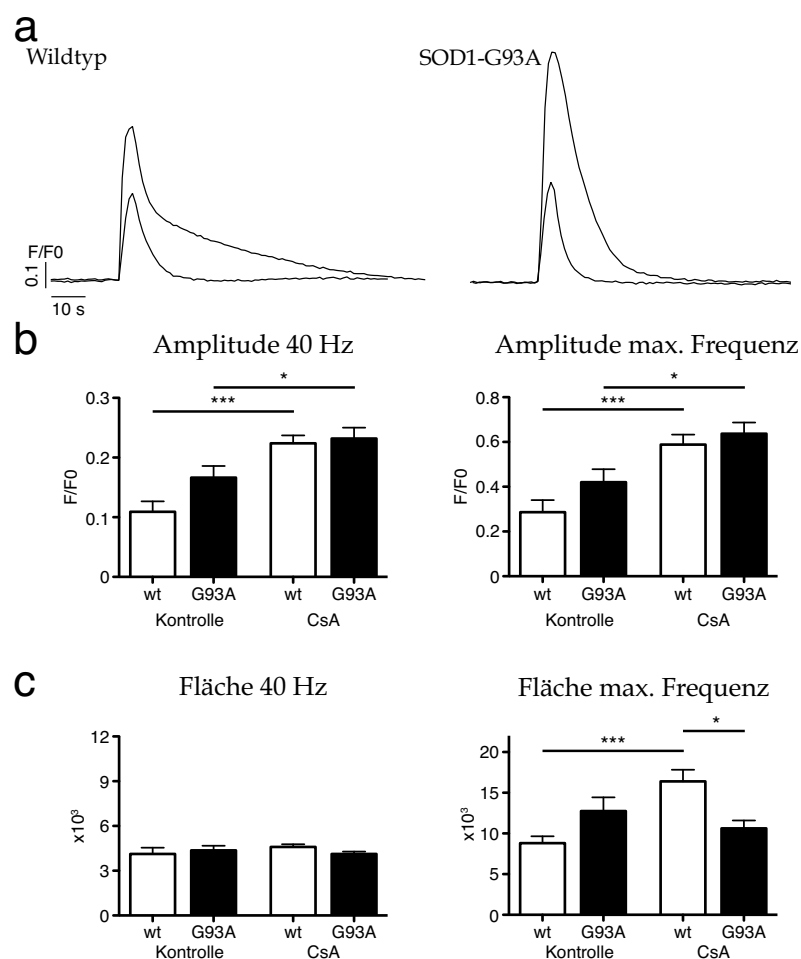


Abbildung 3.14: Blockade der mPTP-Öffnung in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus

Vergleich der Daten aus den Kontrollmessungen ohne Blockade mit denen mit 2 μ M Cyclosporin A. Wt und G93A hMN reagieren unterschiedlich auf Cyclosporin A. (a) Repräsentative Fura-2-Fluoreszenzkurven nach 40 Hz und Maximalfrequenz von wt und G93A hMN. (b) Signalamplituden wurden signifikant größer. (c) Normierte Flächen der Kurven wurden bei Maximalfrequenz signifikant größer bei wt hMN, tendenziell kleiner bei G93A hMN. Tukey Post-Hoc-Test nach ANOVA: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Dazu wurden die Zellen mit dem Farbstoff Rhodamine123 (Rh123) beladen, der sich in Mitochondrien mit intaktem Membranpotential anreichte. Bei kompletter Entkopplung der Mitochondrien mit einer hohen Konzentration FCCP ($5 \mu\text{M}$) wurde Rh123 in das Zytosol freigesetzt und die Fluoreszenzintensität gemessen (siehe Abb. 3.15a). Je hyperpolarisierter das Mitochondrienmembranpotential, desto mehr Rh123 wurde aufgenommen und bei Entkopplung freigesetzt. Die Analysen ergaben keinen signifikanten Unterschied in der Rh123 Fluoreszenzintensität zwischen G93A und wt hMN, sowohl mit einer Intensitätsregistrierung über dem Zellsoma (Signalamplitude wt: 0.092 ± 0.009 , $n=22$; G93A: 0.092 ± 0.006 , $n=24$; $p=0.9804$; wt: $N=7$, G93A: $N=8$, siehe Abb. 3.15b) als auch im umliegenden Gewebe (Signalamplitude wt: 0.096 ± 0.009 , $n=22$; G93A: 0.090 ± 0.006 , $n=23$; $p=0.5684$, siehe Abb. 3.15c). Das mitochondriale Membranpotential der gemessenen Zellen aus Wildtyp- und G93A-Mäusen im Endstadium war somit nicht unterschiedlich. Eine Verringerung der Triebkraft als Grund für die herabgesetzte Calciumaufnahmekapazität in die Mitochondrien von G93A hMN konnte hier nicht nachgewiesen werden. Eine verringerte Transportkapazität des mitochondrialen Uniporters bleibt somit als Erklärung.

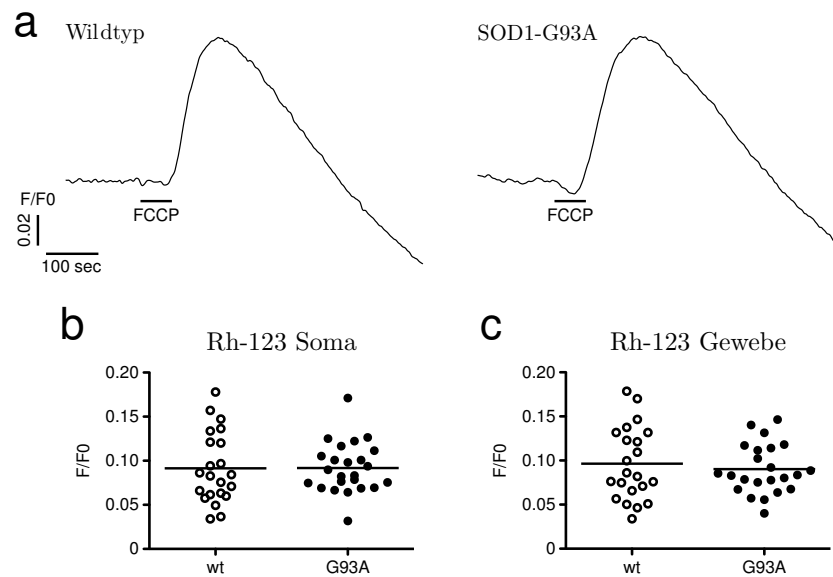


Abbildung 3.15: Mitochondriales Membranpotential

Der Rhodamine123-Fluoreszenzanstieg nach kompletter mitochondrialer Entkopplung mit $5 \mu\text{M}$ FCCP war nicht unterschiedlich zwischen wt und G93A hMN. (a) Repräsentative Rh123 Fluoreszenzkurven von wt und G93A hMN. (b) Die Fluoreszenzänderung gemessen über dem Soma der Zellen war gleich zwischen wt und G93A hMN. (c) Die Fluoreszenzänderung gemessen über dem umgebenden Gewebe war ebenfalls vergleichbar.

3.2.1.4 Calciumspeicherung im Endoplasmatischen Retikulum

Neben den Mitochondrien dient auch das Endoplasmatische Retikulum (ER) als intrazellulärer Calciumspeicher. Dessen Calciumaufnahme ist eng mit den Mitochondrien gekoppelt (siehe 1.3.2). Zur Analyse des Anteils des ER an der Calciumspeicherung von adulten hMN wurden die Hirnschnitte in $1\ \mu\text{M}$ Thapsigargin präinkubiert und die Calciumkinetiken nach elektrischer Stimulation gemessen (siehe Abb. 3.16a). Thapsigargin blockiert die Sarko-Endoplasmatisches Retikulum Calcium-ATPase (SERCA), den Calciumtransporter des ER. Wie bei den mitochondrial wirkenden Pharmaka stieg auch hier die Amplitude des Fura-2-Fluoreszenzsignals bei beiden Genotypen um 60-80% signifikant an (siehe Abb. 3.16b). Der Abfall des Signals ließ sich nicht gut monoexponentiell beschreiben. Die normierte Fläche des Signals von wt und G93A hMN war bei 40 Hz nicht unterschiedlich zu den Kurven ohne Blockade, bei Maximalfrequenz ließen sich auch keine signifikanten Unterschiede feststellen, die Signalfäche der wt Zellen nahm jedoch tendenziell um etwa 40% zu (siehe Abb. 3.16c, Werte siehe Tabelle 3.10)

Diese Ergebnisse lassen auf eine im Vergleich zu Mitochondrien geringere Beteiligung des ER bei der Calciumspeicherung schließen. Motoneurone aus G93A Tieren reagierten etwas weniger auf die Blockade dieses Transportweges als wt hMN.

Parameter	wt (n=23)	G93A (n=25)	ANOVA
Amplitude 40 Hz [F/F0]	0.183 ± 0.013	0.258 ± 0.019	***
Amplitude max [F/F0]	0.522 ± 0.027	0.689 ± 0.039	***
Fläche 40 Hz	4140 ± 298	4721 ± 270	
Fläche max	12172 ± 992	11188 ± 653	

Tabelle 3.10: Blockade der SERCA in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus

ANOVA zum Vergleich der Daten aus den Kontrollmessungen ohne Blockade und denen mit $1\ \mu\text{M}$ Thapsigargin, sowie zwischen wt und G93A, *** $p < 0.001$, Ergebnisse der Post-Hoc-Tests siehe Abb. 3.16, wt: N=3, G93A: N=4

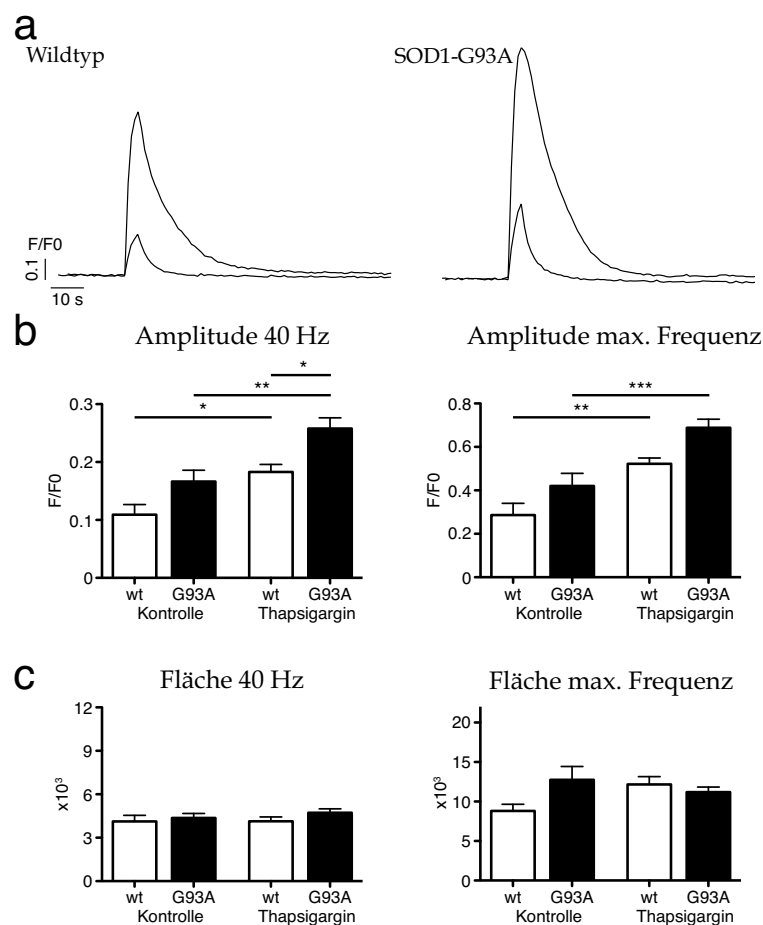


Abbildung 3.16: Blockade der SERCA in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus

Vergleich der Daten aus den Kontrollmessungen ohne Blockade mit denen mit $1 \mu\text{M}$ Thapsigargin. Eine Blockade der Calciumaufnahme in das ER hat eine stärkere Wirkung auf wt hMN als auf G93A hMN. Diese ist jedoch geringer als bei Blockade der Calciumaufnahme in die Mitochondrien. (a) Repräsentative Fura-2-Fluoreszenzkurven nach 40 Hz und Maximalfrequenz von wt und G93A hMN. (b) Signalamplituden werden größer. (c) Normierte Flächen der Kurven werden bei Maximalfrequenz bei wt hMN tendenziell größer. Tukey Post-Hoc-Test nach ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.2.1.5 Calciumextrusion über die Plasmamembran

Neben der Speicherung in intrazellulären Organellen kann Calcium auch über Plasmamembran aus dem Zytosol transportiert werden. Diese Extrusion wird vermittelt durch Calcium-ATPasen (PMCA) oder Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) (siehe 1.3.2). Es gibt keine spezifischen pharmakologischen Hemmstoffe dieser Transporter, eine Analyse dieses Weges musste somit indirekt erfolgen. Blockiert wurde gleichzeitig die Calciumaufnahme in die Mitochondrien durch 200 nM FCCP und die Aufnahme in das ER durch $1 \mu\text{M}$ Thapsigargin (siehe Abb. 3.17a). Calcium, das während der elektrischen Stimulation in die Zellen gelangte, musste somit alleine über die Plasmamembrantransporter aus der Zelle gebracht werden. Folglich war die Amplitude der fluorometrischen Messungen höher als

ohne Blockade, signifikant allerdings nur in G93A hMN bei 40 Hz (siehe Abb. 3.17b). Bei Maximalfrequenz ergab der Post-Hoc-Test nach signifikanter ANOVA einen Unterschied zwischen wt hMN ohne Blockade und G93A hMN mit Blockade. Die meisten Zellen, vor allem die aus Wildtyptieren, waren sehr instabil während der Messungen, eine monoexponentielle Anpassung des Signalabfalls war jedoch gut möglich. Die Zeitkonstante der wt hMN bei 40 Hz Stimulation war nach Blockade etwa dreimal größer als ohne Blockade, bei G93A hMN mehr als doppelt so groß. Der Unterschied in der Zeitkonstante bei 40 Hz zwischen wt und G93A war signifikant. Auch bei Maximalfrequenz nahmen die Zeitkonstanten zu, signifikant jedoch nur bei wt Zellen, die nach Blockade tendenziell eine längere Zeitkonstante als G93A Zellen aufwiesen (siehe Abb. 3.17c). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Auswertung der Signalfäche. Auch hier stiegen die Werte beider Populationen bei 40 Hz um das Dreifache bzw. das Doppelte signifikant an. Bei Maximalfrequenz war der Anstieg nur bei wt hMN signifikant, tendenziell jedoch mit nur 30% auch bei G93A Zellen zu beobachten. Zwischen wt und G93A bestand kein signifikanter Unterschied, allerdings war auch die Fläche bei G93A hMN kleiner als bei wt hMN (siehe Abb. 3.17d). (Werte siehe Tabelle 3.11)

Eine Blockade der Calciumaufnahme in Mitochondrien und ER wirkte sich also stärker auf wt hMN aus als auf G93A hMN. Eine größere Transportkapazität der Plasmamembran-transporter bei G93A hMN ist wahrscheinlich.

Parameter	wt (n=23)	G93A (n=22)	ANOVA
Amplitude 40 Hz [F/F0]	0.174 ± 0.014	0.224 ± 0.013	***
Amplitude max [F/F0]	0.392 ± 0.038	0.486 ± 0.035	*
Zeitkonstante 40 Hz [s]	10.54 ± 1.05	7.93 ± 0.83	***
Zeitkonstante max [s]	22.59 ± 2.30	17.94 ± 2.67	***
Fläche 40 Hz	10706 ± 917	8830 ± 709	***
Fläche max	19195 ± 1518	16686 ± 1856	***

Tabelle 3.11: Calciumtransport über die Plasmamembran in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus

ANOVA zum Vergleich der Daten aus den Kontrollmessungen ohne Blockade und denen mit 200 nM FCCP + 1 μ M Thapsigargin, sowie zwischen wt und G93A, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Ergebnisse der Post-Hoc-Tests siehe Abb. 3.17, wt: N=5, G93A: N=3

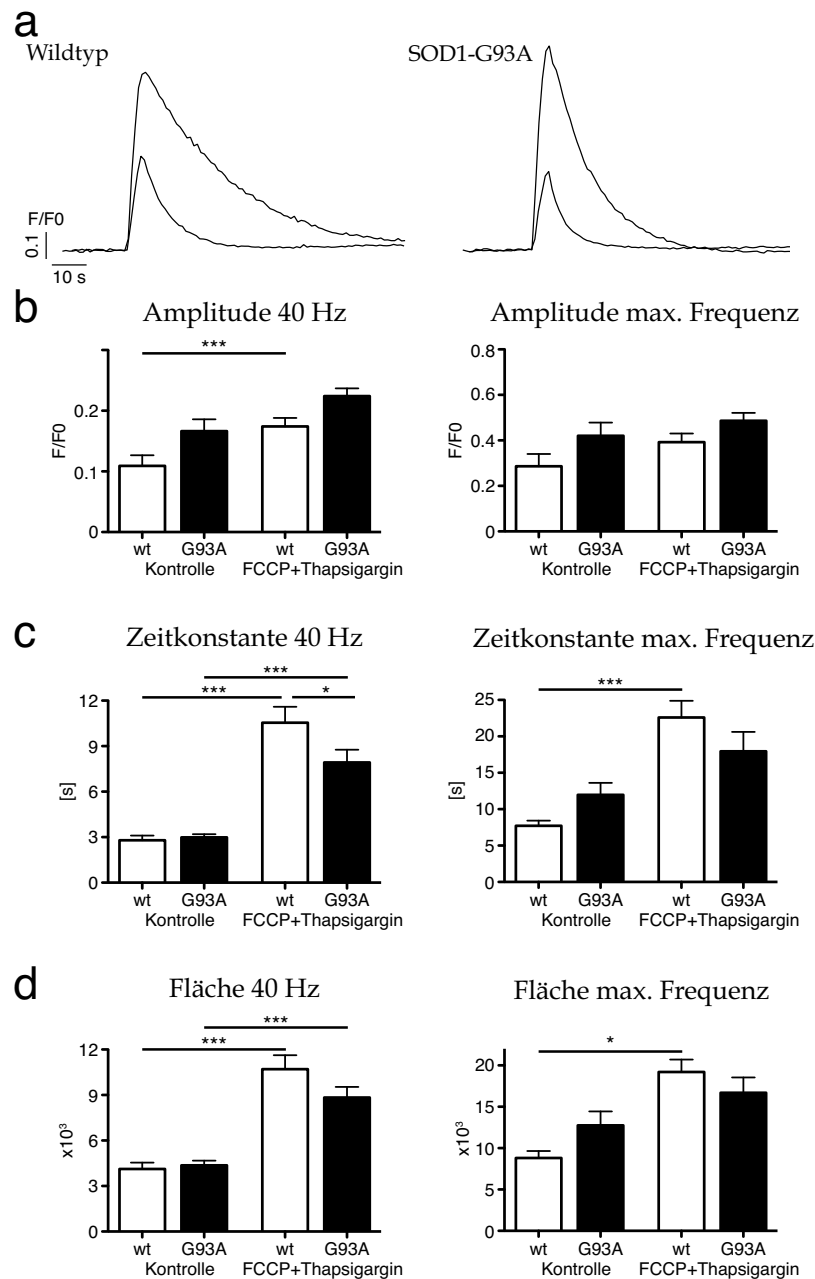


Abbildung 3.17: Calciumtransport über die Plasmamembran in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus

Vergleich der Daten aus den Kontrollmessungen ohne Blockade mit denen mit 200 nM FCCCP+ 1 μ M Thapsigargin. G93A hMN Calciumkinetiken verändern sich weniger stark als die Parameter von wt hMN. Eine höhere Transportleistung der Plasmamembrantransporter ist wahrscheinlich. **(a)** Repräsentative Fura-2-Fluoreszenzkurven nach 40 Hz und Maximalfrequenz von wt und G93A hMN. **(b)** Signalamplituden werden größer. **(c)** Zeitkonstanten nach exponentieller Anpassung der Signalkurven werden vor allem bei wt hMN größer. **(d)** Normierte Flächen der Kurven ändern sich bei wt hMN mehr als bei G93A hMN. Tukey Post-Hoc-Test nach ANOVA: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

3.2.2 Fluorometrische Analyse der Motoneurone des Ncl. Oculomotorius

Wie bei der elektrophysiologischen Grundcharakterisierung sollten auch bei der Calcium-homöostase die Ergebnisse aus Neuronen des vulnerablen Ncl. Hypoglossus mit Messungen von oculomotorischen Neuronen verglichen werden. Hierzu wurden auch oMN mit Fura-2 befüllt und die fluorometrischen Signale nach elektrischer Stimulation registriert.

3.2.2.1 Analyse der Calciumsignale

Im Vergleich der oMN zu den hMN gab es keine Unterschiede in der Signalamplitude bei 40 Hz. Die Zeitkonstante bei 40 Hz war größer in den oMN, nur signifikant mit einem Unterschied von 45% bei wt Zellen. Die Signalfläche bei 40 Hz war nicht signifikant unterschiedlich, weder zwischen oMN und hMN, noch zwischen wt und G93A oMN. Alle Parameter der Calciumkinetiken bei 40 Hz waren also ähnlich bei hMN und oMN.

Bei Maximalfrequenz war die Amplitude der Fluoreszenzsignale größer in oMN im Vergleich zu den Werten aus hMN, wiederum nur signifikant bei wt Zellen. Fläche und Zeitkonstante von wt oMN bei Maximalfrequenz waren nur etwa halb so groß, aber nicht signifikant unterschiedlich zu wt Zellen aus dem Ncl. Hypoglossus. Die Werte von Zeitkonstante und Fläche der G93A oMN betrugen nur etwa ein Drittel der Werte aus G93A hMN. Der Unterschied zwischen G93A hMN und G93A oMN war signifikant. Der Unterschied in der Geschwindigkeit und Fläche des Calciumsignals bei G93A hMN im Vergleich zum wt hMN ließ sich im Ncl. Oculomotorius nicht feststellen. Beide Parameter der G93A oMN waren ähnlich zu denen von wt oMN (Werte siehe Tabelle 3.12). Eine Beeinträchtigung der Erholung des Calciumsignals konnte bei den resistenten Zellen im Gegensatz zu den vulnerablen Zellen im Endstadium der Krankheit somit nicht beobachtet werden.

Parameter	wt (n=25)	G93A (n=26)	ANOVA
Amplitude 40 Hz [F/F0]	0.163 ± 0.014	0.177 ± 0.016	*
Amplitude max [F/F0]	0.478 ± 0.025	0.581 ± 0.032	***
Zeitkonstante 40 Hz [s]	4.07 ± 0.29	3.85 ± 0.28	**
Zeitkonstante max [s]	5.85 ± 0.39	6.87 ± 0.56	***
Fläche 40 Hz	5022 ± 268	5190 ± 279	
Fläche max	7603 ± 377	8445 ± 526	**

Tabelle 3.12: Calciumsignale der Motoneurone des Ncl. Oculomotorius

ANOVA zum Vergleich der Daten aus den Messungen der Calciumsignale des Ncl. Hypoglossus und des Ncl. Oculomotorius, sowie zwischen wt und G93A, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Ergebnisse der Post-Hoc-Tests siehe Abb. 3.18, wt: N=6, G93A: N=4

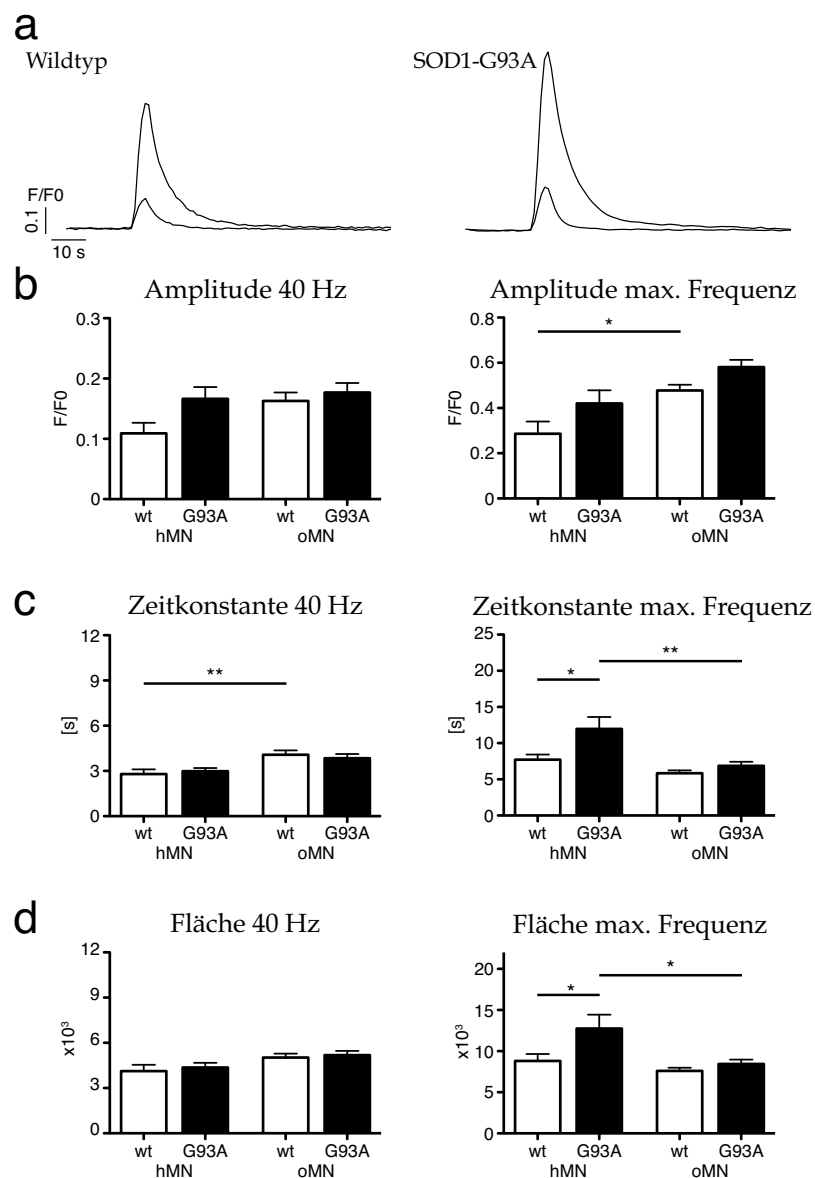


Abbildung 3.18: Calciumsignale der Motoneurone des Ncl. Oculomotorius

Vergleich der Daten aus den Kontrollmessungen im Ncl. Hypoglossus mit denen im Ncl. Oculomotorius. Zwischen G93A und wt oMN bestanden keine signifikanten Unterschiede. Zeitkonstante und Fläche der G93A oMN waren aber signifikant kleiner als bei G93A hMN. (a) Repräsentative Fura-2-Fluoreszenzkurven nach 40 Hz und Maximalfrequenz von wt und G93A oMN. (b) Signalamplituden sind tendenziell größer bei oMN. (c) Zeitkonstanten nach exponentieller Anpassung der Signalkurven. (d) Normierte Flächen der Kurven. Tukey Post-Hoc-Test nach ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.2.2.2 Calciumtransport in die Mitochondrien

Um eine kompensierte mitochondriale Schädigung in oMN auszuschließen, wurde zuletzt noch die Reaktion der oculomotorischen Zellen auf mitochondriale Entkopplung mittels 80 nM FCCP untersucht (siehe Abb. 3.19a). Sowohl die oMN aus Wildtypmäusen als auch G93A oMN reagierten generell deutlich weniger auf diesen Stressor als die hMN. Die Signalamplitude wurde tendenziell geringer im Vergleich zu den Signalen von oMN ohne Entkopplung, signifikant nur bei G93A oMN bei Maximalfrequenz (siehe Abb. 3.19b). Die Zeitkonstante und die Signalfäche bei 40 Hz wurde größer, auch hier nur signifikant bei G93A oMN mit einem Anstieg um etwa 70%. Bei Maximalfrequenz nahm die Zeitkonstante bei wt und G93A oMN um etwa ein Drittel nicht signifikant zu, die Fläche wurde etwa zwei Drittel größer, signifikant bei G93A oMN. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen wt und G93A (siehe Abb. 3.19c,d, Werte siehe Tabelle 3.13). Es gab somit keine Hinweise für eine mitochondriale Schädigung von G93A oMN.

Parameter	wt (n=22)	G93A (n=23)	ANOVA
Amplitude 40 Hz [F/F0]	0.143 ± 0.012	0.141 ± 0.011	
Amplitude max [F/F0]	0.394 ± 0.025	0.395 ± 0.033	***
Zeitkonstante 40 Hz [s]	4.53 ± 0.43	5.25 ± 0.42	*
Zeitkonstante max [s]	9.38 ± 1.56	10.08 ± 1.44	*
Fläche 40 Hz	6128 ± 746	5920 ± 431	
Fläche max	10338 ± 1140	11653 ± 1202	**

Tabelle 3.13: Mitochondriale Entkopplung der Motoneurone des Ncl. Oculomotorius

ANOVA zum Vergleich der Daten aus den Messungen der Calciumkinetiken des Ncl. Oculomotorius ohne Entkopplung und mit 80 nM FCCP, sowie zwischen wt und G93A, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Ergebnisse der Post-Hoc-Tests siehe Abb. 3.19, wt: N=4, G93A: N=5

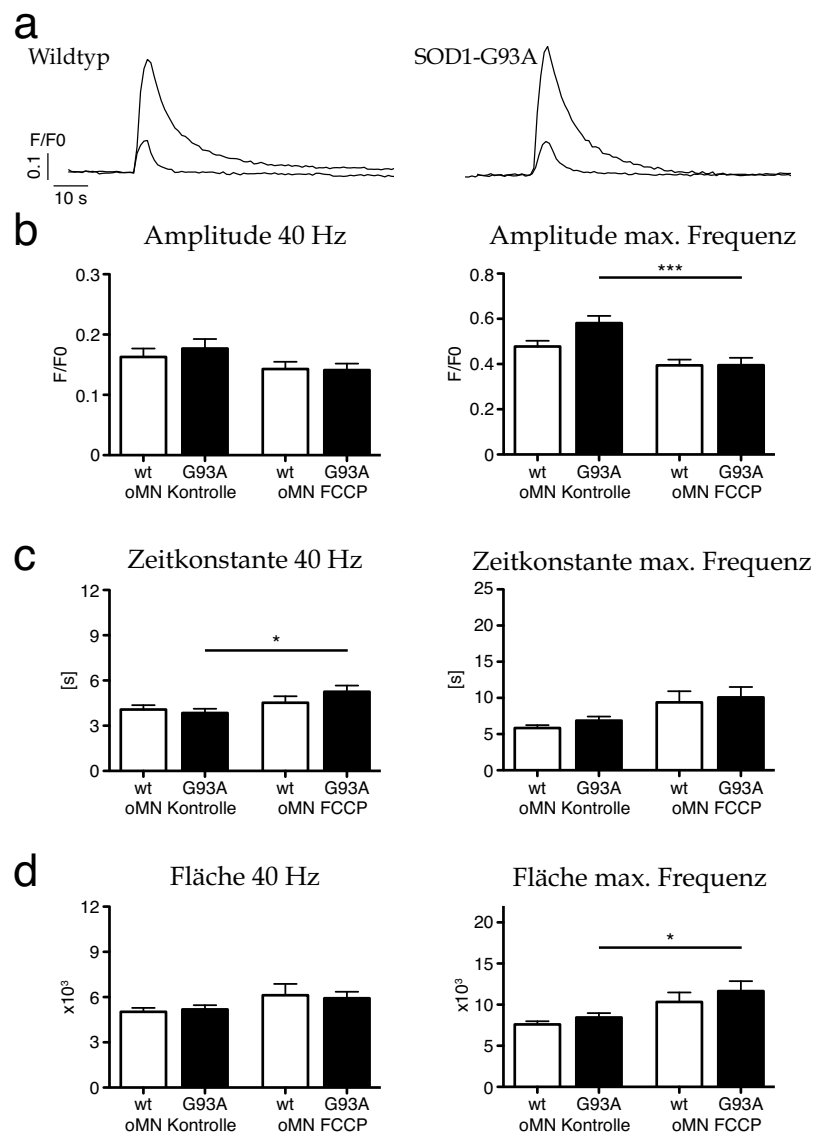


Abbildung 3.19: Mitochondriale Entkopplung der Motoneurone des Ncl. Oculomotorius

Vergleich der Daten aus den Messungen der Calciumsignale des Ncl. Oculomotorius ohne Entkopplung und mit 80 nM FCCP. Sowohl bei wt als auch bei G93A oMN verlangsamte sich die Erholung des Calciumsignals bei mitochondrialer Entkopplung. **(a)** Repräsentative Fura-2-Fluoreszenzkurven nach 40 Hz und Maximalfrequenz von wt und G93A oMN. **(b)** Signalamplituden werden tendenziell kleiner nach Entkopplung. **(c)** Zeitkonstanten nach exponentieller Anpassung der Signalkurven werden tendenziell größer. **(d)** Normierte Flächen der Kurven wurden größer, signifikant bei G93A oMN bei Maximalfrequenz. Tukey Post-Hoc-Test nach ANOVA: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Diskussion

Mittels elektrophysiologischer und fluorometrischer Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit adulte Motoneurone im Hirnstamm charakterisiert. Ziel war es durch die Untersuchung der Motoneurone in einem ALS-Mausmodell Hinweise auf Degenerationsmechanismen und Erklärungen für die differentielle Vulnerabilität bei dieser neurodegenerativen Erkrankung zu finden. Zusammenfassend ließ sich bei den dargestellten Daten eine weitestgehend unauffällige Elektrophysiologie, dagegen aber eine deutliche Störung der intrazellulären Calciumhomöostase bei adulten Motoneuronen im SOD1-G93A ALS-Mausmodell in der Endphase der Krankheit beobachten. Die Auffälligkeiten beschränkten sich auf den vulnerablen Ncl. Hypoglossus, keine Unterschiede gab es zwischen wt und G93A Motoneuronen des resistenten Ncl. Oculomotorius. Eine Calciumüberladung der Motoneurone als Ursache der Neurodegeneration bei ALS wurde bisher wiederholt vermutet [Van Den Bosch et al., 2006; Grosskreutz et al., 2010; Kawamata and Manfredi, 2010]. Ein direkter Nachweis auf Einzelzellebene im Gewebeschnitt zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Krankheit, an dem die Neurone absterben, sowie ein Aufdecken zugrunde liegender Mechanismen durch die Analyse der beteiligten Transporter, konnte mit dieser Arbeit nun erstmalig erbracht werden.

4.1 Methodik und Mausmodell

Die erhöhte Vulnerabilität bei mechanischer und energetischer Belastung und der hohe Anteil an Myelin erschwerten bisher Einzelzellanalysen adulter Motoneurone in Schnittpräparationen [Jaiswal and Keller, 2009; Manuel et al., 2009]. *Patch-Clamp*-Analysen wurden vor allem in Kultur oder an früh postnatalen Mäusen durchgeführt [Pieri et al., 2003; Kuo et al., 2004, 2005; Amendola et al., 2007; van Zundert et al., 2008; Pambo-Pambo et al., 2009; Quinlan et al., 2011]. Eine Ausnahme bildet die kürzlich veröffentlichte Methodenbeschreibung zur Präparation adulter, spinaler Motoneurone zur *Whole-Cell*-Messung von MN bis P68 [Mitra and Brownstone, 2011]. Dabei wurden die Schnitte durch Polyethylenglykol-Behandlung und Lösungen mit hohen Konzentrationen an Metaboliten und Antioxidanzien erfolgreich am Leben gehalten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine andere Strategie gewählt. Die kardiale Perfusion der Maus mit einer erregungsdämpfenden und kühlenden, Sucrose-haltigen Lösung und vorsichtiger Präparation, die im Zuge meiner Diplomarbeit entwickelt und während der Doktorarbeit optimiert wurde, reichte aus, um vitale Schnitte

zu erhalten. Eine starke Modifikation der Badlösung war nicht erforderlich. Dieses Vorgehen war ein für MN angepasstes, in der Arbeitsgruppe in Frankfurt etabliertes Protokoll für adulte dopaminerge Neurone [Lammel et al., 2008]. Mittels des *Patch-Clamp*-Verfahrens gelang so erstmals eine Beschreibung elektrophysiologischer Eigenschaften adulter Motoneurone im Hirnschnitt der Maus.

Eine Schnittpräparation ermöglicht die Analyse intrinsischer Eigenschaften von Zellen, eine modulatorische Veränderung dieser durch synaptische Eingänge war aber durch das präparatorische Entfernen der Projektionen und der zusätzlichen pharmakologischen Blockade von GABAergen und glutamatergen Rezeptoren nicht messbar. Außerdem werden durch das Schneiden Dendriten und Axone auf unterschiedlicher Länge durchtrennt, was die biophysikalische Variabilität von Zelle zu Zelle erhöhte [Bekkers and Häusser, 2007; Kole, 2011]. Unphysiologisch, jedoch Standard, war der hohe Sauerstoffanteil von 95% in der Badlösung. Gemessen wurde bei physiologischen Temperaturen von 36 °C. Auch eine Veränderung des intrazellulären Milieus ist ein Nachteil der Methode. Das große Volumen der Pipettenlösung im Gegensatz zu dem kleinen Volumen der Zelle führt zum Auswaschen von Signalmolekülen durch Diffusion. Um ATP-abhängige Prozesse der Calciumhomöostase dadurch nicht zu verändern, wurde der Pipettenlösung bei den fluorometrischen Messungen ATP zugefügt. Durch all diese experimentellen Faktoren wurden unter Umständen Neuroneneigenschaften verfälscht oder entzogen sich einer Analyse. Eine bessere, wenn auch deutlich schwierigere Methode wäre eine *Patch-Clamp*-Messung im lebenden Tier, die bisher aber für Motoneurone noch nicht beschrieben wurde. Erste elektrophysiologische *in vivo*-Messungen adulter anästhesierter Mäuse mit intrazellulären Ableittechniken im Spinalmark versprechen hier Fortschritt [Manuel et al., 2009; Meehan et al., 2010b]. Auch eine fluorometrische *in vivo*-Messung von Motoneuronen wurde aufgrund schlechter anatomischer Zugänglichkeit noch nicht durchgeführt. Die *Patch-Clamp*-Methode im Hirnschnitt ist somit die zur Zeit am besten etablierte Möglichkeit der elektrophysiologischen und fluorometrischen Charakterisierung von Motoneuronen und die Weiterentwicklung der Präparation für adulte murine Hirnschnitte ein großer Fortschritt, um neurodegenerative Krankheiten mit spätem Symptombeginn besser untersuchen zu können.

Zusätzlich zur generellen Charakterisierung adulter Motoneuroneigenschaften wurden diese mit den Eigenschaften der Neurone im SOD1-G93A Mausmodell der ALS verglichen. Die transgene Mauslinie ist bisher der Standard in der ALS-Grundlagenforschung und das meist verwendete Modell für die Testung von Therapeutika, gerät aber immer mehr in Kritik. Neben der generellen Problematik, neurodegenerative Krankheiten in Tiermodellen nachzustellen, wird angemerkt, dass dieses Mausmodell nur den Teil der Patienten mit familiärer SOD1-begründeter ALS repräsentiere und für die sporadischen Fälle nicht aussagekräftig sei [Rothstein, 2009]. Der Befund eines Vorkommens von TDP-43 in ubiquitinären Ablagerungen aller ALS-Patienten außer der Patienten mit SOD1-Mutation sowie ebenfalls

einer Abwesenheit von TDP-43 Aggregaten im SOD1-Mausmodell [Mackenzie et al., 2007; Robertson et al., 2007] bestärkt diesen Kritikpunkt und beschränkt die Übertragbarkeit des Modells weiter. Studien über Pathomechanismen in jungen Tieren und Verzögerungen des Symptombeginns werden daher kritisch gesehen [Kiernan et al., 2011]. Da in der vorliegenden Arbeit allerdings Mäuse in einem sehr späten Krankheitsstadium verwendet wurden, ist eine Übertragbarkeit auf sporadische Formen wahrscheinlich möglich, wenn von einer gemeinsamen Endstrecke aller Formen bei der Motoneurondegeneration ausgegangen werden kann, wie es immer wieder postuliert wird [Bosco et al., 2010; Kwak et al., 2010]. Zur Bestätigung sollten aber in zukünftigen Arbeiten die neuen Mausmodelle mit TDP-43 Mutationen [Wegorzewska and Baloh, 2010] zusätzlich analysiert werden.

Um die Variabilität der Messungen so klein wie möglich zu halten, wurden einige experimentelle Einschränkungen vorgenommen. Es wurden nur männliche Mäuse verwendet, da zum einen der Hormonzyklus weiblicher Mäuse die elektrophysiologischen Eigenschaften beeinflussen könnte [Scharfman et al., 2003] und zum anderen das Fortschreiten der Neurodegeneration und die Symptomentwicklung bei männlichen Tieren in der Regel schneller abläuft als bei Weibchen [Alves et al., 2011]. Weiterhin wurden die G93A-Tiere nicht nur nach ihrem Alter für die Versuche ausgewählt. Bei der Heterozygotenzucht des transgenen Stammes mit gemischtem genetischen Hintergrund (C57Bl6 und SJL) kann es nicht nur zu einem Kopienverlust des Transgens kommen [Alexander et al., 2004], sondern auch zu Varianzen im Hintergrund, was sich unter anderem an den unterschiedlichen Fellfarben festmachen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass SOD1-G93A transgene Tiere unterschiedlichen Hintergrunds und je nach exprimierter Kopienzahl deutliche Unterschiede in der Schwere der Symptomatik und in der Lebensdauer zeigen [Alexander et al., 2004; Heiman-Patterson et al., 2005; Henriques et al., 2010]. Um diese Variabilität auszugleichen, wurde das Endstadium der Krankheit auch anhand der Symptomatik festgelegt. Am besten beschrieben war dafür die Beobachtung des Paralysestatus der Hinterbeine [Solomon et al., 2011]. Nach einer kompletten Lähmung versterben die Tiere innerhalb weniger Tage, aus ethischen Gründen wurde mit der funktionellen Paralyse mit vorhandenem Aufrichtreflex ein präfinales Stadium gewählt.

Untersucht wurden aber nicht die Eigenschaften der lumbalen Motoneurone, die die Muskeln der Hinterbeine innervieren, sondern die Neurone für Zungen- und Augenbewegung. Aus der Symptomatik der Beinmuskulatur auf den Krankheitsstatus der Neurone des Ncl. Hypoglossus zu schließen ist nicht direkt möglich, ein Test der Zungenfunktion wäre nötig. Mit Hilfe der publizierten physiologischen und anatomischen Beobachtungen ist aber eine Abschätzung durchführbar, was die komplizierten Tests verzichtbar macht. Um P77 wurden erste Einschränkungen der Motilität anhand einer Verringerung der Leckfrequenz beobachtet [Fuchs et al., 2010a]. Mit P125, dem ungefähren Alter der hier verwendeten G93A-Mäuse, war eine zusätzliche deutliche Verschlechterung sichtbar. Die Zunge konnte

noch mit einer Frequenz von ca. 8 Hz herausgestreckt werden, im Gegensatz zu ca. 10 Hz bei Wildtyptieren, war also zu dem Zeitpunkt einer kompletten Lähmung der Hinterbeine nicht komplett paralytisiert. Dieses frühere Stadium lässt sich auch durch die Ergebnisse einer Zellzählung belegen, nach der im Endstadium spinal eine Abnahme der Zellzahl um weit über 50% [Jaarsma et al., 1996; Kieran et al., 2004], im Ncl. Hypoglossus aber nur um etwa 30% beobachtet wurde [Haenggeli and Kato, 2002]. Man kann somit schließen, dass im verwendeten Mausmodell ein Endstadium der spinalen Motoneurone einem früheren Krankheitsstadium der bulbären Neurone entspricht.

Als Folge unterschiedlich schneller Reifung der Neurone, unterschiedlicher Zelltypen und Entladungseigenschaften und ungleichen Stressoren auch in einer vermeintlich homogenen Zellpopulation in einem Kern kommt es während des Krankheitsfortschritts der ALS zu Varianzen in der Belastung und dem Gesundheitsstatus der einzelnen Zellen. In dem untersuchten Kern zu dem definierten Zeitpunkt ist deshalb zu erwarten, dass man eine sehr inhomogene Zellpopulation vorfindet: Zellen, die sich bereits im Endstadium des Degenerationsprozesses befinden (diese lassen sich nicht mehr mit den hier verwendeten Methoden untersuchen, da die Zellmembran zu fragil wird) und einen fließenden Übergang von Zellen, die deutlich geschädigt sind, aber noch eine stabile Membran haben, bis hin zu Zellen, die noch weitestgehend gesund und eventuell komplett resistent sind. Es war bei den hier durchgeführten Messungen nicht möglich, die eine Präparation überlebenden Zellen durch einen Marker oder histologische Auffälligkeiten in gesund und krank zu klassifizieren. Eine hohe Variabilität der Daten war daher zu erwarten. Eine Analyse der noch vorhandenen spinalen Motoneurone zum gleichen Zeitpunkt würde überwiegend resistente Zellen beschreiben und man könnte dort die Ursache der differentiellen Vulnerabilität besser untersuchen. Diese Messung ist mit der vor kurzem veröffentlichten Methode von Mitra und Brownstone zur Präparation adulter spinaler Schnitte wahrscheinlich durchführbar [Mitra and Brownstone, 2011]. Ein Aufdecken der Degenerationsmechanismen verlangt aber eine Analyse degenerierender Zellen, was im Ncl. Hypoglossus im Endstadium der ALS im verwendeten Mausmodell möglich ist. Trotz eines finalen Stadiums konnten also im Ncl. Hypoglossus Unterschiede entdeckt werden, die zum Zelltod führen könnten. Die Wahl eines früheren Stadiums wäre in dieser Hinsicht weniger aussagekräftig. Zum Vergleich wurden einige der Messungen auch bei Tieren im präsymptomatischen Stadium (P65-P75) unter meiner Anleitung von Sylvie Kutterer im Rahmen ihrer Diplom- und weiteren wissenschaftlichen Arbeit durchgeführt [Kutterer, 2011]. Die Ergebnisse aus präsymptomatischen Tieren sollen zum Vergleich auch ausschnittsweise dargestellt und hier diskutiert werden.

4.2 Deutung und Einordnung der elektrophysiologischen Charakterisierung

Eine elektrophysiologische Charakterisierung dient dazu, Eigenschaften von Neuronen zu beschreiben, die Auskunft über den Kanalbesatz liefern und deren Verhalten auf synaptische Eingänge und aktive Informationsgenerierung und -weiterleitung vorhersagen.

4.2.1 Weitere Reifung der Motoneurone nach P10

Bisher gab es kaum elektrophysiologische Daten von adulten Motoneuronen [Meehan et al., 2010b; Manuel et al., 2009; Mitra and Brownstone, 2011]. Die *Patch-Clamp*-Messungen im Schnittpräparat beschränkten sich v.a. auf früh postnatale Mäuse (<P10). Eine Ausnahme ist die Beschreibung der Eigenschaften weniger lumbaler Motoneurone bis P68, die vor kurzem veröffentlicht wurde [Mitra and Brownstone, 2011]. Elektrophysiologische Charakteristika von Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus und des Ncl. Oculomotorius oder Neurone im ALS-Mausmodell wurden noch nie in adulten Mäusen analysiert. Die Entwicklung der Neurone ist aber sicher nicht mit zehn Postnataltagen abgeschlossen, was in Ratten auch durch eine Veränderung der Elektrophysiologie bis zu P20 gezeigt wurde [Viana et al., 1995; Berger et al., 1996; Carrascal et al., 2005]. Über P20 hinaus existieren keine *Patch-Clamp*-Studien von Hirnstamm-Motoneuronen, weder in der Maus noch in der Ratte.

In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der Arbeiten zusammengestellt, die von der Durchführung (*Patch-Clamp*-Messung in einer Schnittpräparation) am ehesten mit den bei dieser Arbeit gewonnenen Daten verglichen werden können. Ein Vergleich früh postnataler Daten mit denen der adulten Tiere zeigt bei den meisten Parametern einen deutlichen Unterschied und somit eine Weiterentwicklung und Ausreifung der Neurone, die ansatzweise zwischen der ersten und zweiten postnatalen Woche schon zu sehen sind. Zum Beispiel wird der Eingangswiderstand kleiner und die Rheobase dementsprechend größer. Die Aktionspotentiale werden um mehr als die Hälfte kürzer mit größerer Nachhyperpolarisation und die Erregbarkeit (Steigung der Frequenz-Strom-Kurve) und Maximalfrequenz steigen. Die adulten Motoneurone können somit bei geringer synaptischer Erregung deutlich mehr Impulse pro Sekunde generieren, was zu einer flüssigeren und feiner abgestimmten Bewegung im ausgereiften System führt. Als Grund für die Veränderungen kann ein deutlich unterschiedlicher Kanalbesatz zwischen früh postnatalen und adulten Motoneuronen postuliert werden. Mehr Leckkanäle können den Eingangswiderstand verringern [Lesage, 2003], eine andere Zusammensetzung und eine schnellere Erholung aus der Inaktivierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen und die Expression von Kaliumkanälen z.B. vom Typ K_v3 beschleunigen das Aktionspotential und die mögliche Frequenz [Rudy and McBain, 2001; Zona et al., 2006]. Zum Nachweis der genauen Kanalveränderungen fehlen *Voltage-Clamp*- und Genexpressionsdaten, die *Current-Clamp*-Ergebnisse liefern aber bereits Hinweise.

	Quinlan et al. 2011	Quinlan et al. 2011	Pambo-Pambo et al. 2009	van Zundert et al. 2008	Kutterer 2011	Mitra et al. 2011	Kutterer 2011	eigene Befunde
Präparat	spinal	spinal	spinal	hMN	hMN	spinal	hMN	hMN
Alter	P0-P5	P6-P10	P6-P10	P4-P10	P8-P12	P43-P68	P65-P75	P120-P138
C_m [pF]	273	326			67		65	54
R_i [M Ω]			35	111	142	123	110	101
V_{Ruhe} [mV]	-57	-60	-58	-59	-45	-73	-45	-50
sag [mV]					7.8		13.2	11.6
AP Schwelle [mV]	-29	-30	-35	-38	-35	-57	-34	-30
AP Dauer [ms]	1.5	1.1	1/2: 0.8	3.7	2.1	1/2: 0.7	1.1	0.9
AP Ampl. [mV]	57	60	59	69	87	73	99	71
AHP Ampl. [mV]	9	9	12	27	18	15	23	20
f-I [Hz/pA]	35	31	80		20	0.09	10	75
f_{max} [Hz]					75		130	146
cAHP Ampl. [mV]	5.5	2.5			4.0		12.3	12.9
I_a [pA]	368	664	1000		172	113	259	242
I_e [pA]	420	781			194		309	305

Tabelle 4.1: Literaturvergleich der elektrophysiologischen Charakteristika von Motoneuronen in Wildtypmäusen C_m : Membrankapazität, R_i : Eingangswiderstand, V_{Ruhe} : Ruhemembranpotential, Ampl.: Amplitude, f-I : Steigung der Frequenz-Strom-Kurve, f_{max} : Maximalfrequenz, I_a : Rheobase bei einer aufsteigenden Stromrampe (erstes AP), I_e : Rheobase bei einer absteigenden Stromrampe (letztes AP); 1/2: Dauer des AP bestimmt bei halbmaximaler Amplitude

Auch noch zwischen P70 und P120 verändern sich in Wildtypmäusen einige Parameter wie die Membrankapazität und die AP Dauer [Kutterer, 2011], was auf eine dynamisch mit dem Alter variierende Aktivitätsänderung der untersuchten Motoneuronpopulation schließen lässt. Zwischen Motoneuronsubtypen gleichen Alters aber unterschiedlicher Lokalisation gibt es große Unterschiede in der Erregbarkeit, Aktionspotentialparametern und dem Ruhepotential. So sind z.B. lumbale MN um P65 deutlich hyperpolarisierter in Ruhe als altersgleiche Neurone des Ncl. Hypoglossus [Kutterer, 2011; Mitra and Brownstone, 2011]. Generell lässt sich allerdings nicht ausschließen, dass eine Variabilität im verwendeten Mausstamm, der Präparation, in den verwendeten Lösungen und Temperaturen und insbesondere in der Stichprobengröße und Art der Datenauswertung einigen Unterschieden zugrunde liegt.

Eine detaillierte Bestimmung aller Parameter bei je nach Fragestellung passendem Alter und Kerngebiet mit konstanten Messbedingungen ist für jede neue Studie essentiell. So konnten auch die elektrophysiologischen Daten, die im Rahmen meiner Diplomarbeit gewonnen wurden, hier nicht verwendet werden. Die extrem kleine Stichprobe bei hoher Variabilität ($n=6$) und eine zu geringe Abtastfrequenz, die einige Parameter wie die AP Amplitude verfälscht, sind hierfür der Hauptgrund.

4.2.2 Erregbarkeit und persistierende Einwärtsströme adulter Motoneurone im ALS-Modell

Die meisten der bisher veröffentlichten elektrophysiologischen Daten zur Beschreibung von Eigenschaften der Motoneurone bei ALS zeigten eine verstärkte Erregbarkeit und eine signifikante Erhöhung persistierender Einwärtsströme und begründen damit die Neurodegeneration [Mogyoros et al., 1998; Kuo et al., 2005; Kanai et al., 2006; van Zundert et al., 2008; Meehan et al., 2010a; Quinlan et al., 2011]. Gewonnen wurden diese Daten in embryonalen Motoneuronkulturen und Schnitten aus ALS-Mausmodellen bis zu einem Alter von P10, auch im Ncl. Hypoglossus, allerdings aber auch durch Messungen humaner Axone. Mit den hier vorgestellten Ergebnissen aus deutlich älteren Tieren in einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit lassen sich diese Befunde nicht bestätigen. Die Steigungen der Frequenz-Strom-Kurven waren nicht unterschiedlich zwischen Wildtyp und G93A hMN und auch in allen ausgewerteten Parametern der Messung von persistierenden Natriumeinwärtsströmen glichen sich gesunde und kranke Tiere.

Durch die Analyse zu einem Zeitpunkt starker Neurodegeneration kann man folglich schließen, dass eine intrinsisch erhöhte Erregbarkeit und persistierende Natriumströme eher nicht direkt zur Degeneration der Neurone im verwendeten Mausmodell beitragen. Eine erhöhte Erregbarkeit in früh postnatalem Alter könnte jedoch zu frühem Zellstress und adaptiven Veränderungen der intrinsischen Eigenschaften führen, die dann später letal sind. Ein bei dieser Arbeit gezeigtes signifikant hyperpolarisiertes Membranpotential und eine depo-

larisiertere Aktionspotentialschwelle in G93A hMN könnten Auswirkungen der Anpassung sein, da beides eher auf eine verringerte Erregbarkeit hinweist. Eine höhere Kaliumleckleitfähigkeit könnte diesem Effekt zugrunde liegen [Lesage, 2003]. Ein verstärkter Strom durch hyperpolarisationsaktivierte Kaliumkanäle (HCN) würde die Veränderung ebenfalls erklären, ist aber unwahrscheinlich, da die Reaktion auf Hyperpolarisation nicht unterschiedlich ist. Calciumabhängige Kaliumkanäle modifizieren auch Schwelle und Ruhepotential [Deister et al., 2009]. Eine Tendenz zu einer kleineren AHP-Amplitude aber zu einer größeren cAHP-Amplitude lässt allerdings ohne genaue Analyse der zugrundeliegenden Ströme keine Aussage zu. Die gezeigten Störungen der Calciumhomöostase könnten das Ruhemembranpotential durch eine Modifikation calciumabhängiger Kanäle und Signalwege verändern. In hippocampalen CA1 Neuronen konnte ein altersbedingter Anstieg der cAHP-Amplitude beobachtet werden. Als Grund wurde eine verstärkte calciuminduzierte Calciumfreisetzung durch RyR aufgrund von oxidativer Schädigung gezeigt [Bodhinathan et al., 2010]. Auch sind BK-Kanäle durch oxidative Prozesse direkt modulierbar [DiChiara and Reinhart, 1997], die wegen der mutierten SOD1 in den transgenen Tieren hier auch den Unterschieden zwischen wt und G93A zugrunde liegen könnten. Ein Anstieg von Strömen durch calciumabhängige Kaliumkanäle würde auch erklären, wieso die Frequenz-Strom-Kurven bei adulten G93A Neuronen nicht steiler sind als bei wt Neuronen, wie es bei juvenilen Tieren noch der Fall ist. In einem Motoneuron-Modell konnte gezeigt werden, dass diese Kaliumströme die Generierung von neuen Aktionspotentialen bei gleichem Strom deutlich verringern [Wada and Sakaguchi, 2007], was auch *in vitro* bestätigt werden konnte [Lape and Nistri, 2000].

Die Messungen dieser Arbeit beschränken sich auf Motoneurone im Hirnstamm. Im Gegensatz zu spinalen Motoneuronen finden sich im Ncl. Hypoglossus keine Typ S Motoneurone [Volz et al., 2007], es konnte bisher keine Bistabilität nachgewiesen werden [Bayliss et al., 1997]. Auch persistierende Calciumströme sind weniger stark ausgeprägt als im Rückenmark, was durch die nahezu komplette Ausschaltung einer Einwärtsstromkomponente durch TTX bestätigt werden konnte (siehe Abb. 3.5). Ob die früh postnatal gezeigte Erhöhung persistierender Ströme bei adulten Mäusen im Spinalmark bei Typ S MN eine Rolle bei der höheren Vulnerabilität dieser Neuronenpopulation spielt, kann nicht ausgeschlossen werden. Auch die Verstärkung der persistierenden Ströme durch modulatorische Einflüsse wie Serotonin könnte unterschiedlich sein, wurde hier aber nicht untersucht.

Bei den Auswertungen der PIC gilt anzumerken, dass der Vergleich der Maximalströme schwierig ist, da je nach zusätzlich auftretendem Auswärtsstrom die PIC überlagert und verringert werden. Besser ist die Darstellung der Boltzmannkurven. Für eine bessere quantitative Aussage wäre eine pharmakologische Blockade der Auswärtsströme sinnvoll. Für die Vergleichbarkeit mit Literaturdaten wurden Messung und Analyse aber wie in [van Zundert et al., 2008] beschrieben durchgeführt.

Die erhöhte Erregbarkeit und der stärkere persistierende Strom sowie ein verringerter Eingangswiderstand wurde auch als mögliche Auswirkung einer schnelleren Entwicklung von Motoneuronen mit mutierter SOD1 angesehen [Quinlan et al., 2011; Amendola et al., 2007; Elbasiouny et al., 2010]. Ein Angleichen der Werte auf dem Niveau der kranken Zellen bei fortgeschrittenem Alter würde diese These unterstützen. Vergleicht man die hier gemessenen Stromdichten persistierender Natriumströme mit denen aus hMN von G93A-Mäusen im Alter von P4-P10 [van Zundert et al., 2008], liegen die bei adulten Tieren gemessenen Werte aber im Bereich der juvenilen Wildtypzellen, was eher gegen diese Theorie sprechen würde. Andere Messbedingungen, wie eine höhere Temperatur, könnten jedoch zu Unterschieden im Absolutwert des Stroms führen.

Wie bereits diskutiert kann man wegen der Unterschiede im Gesundheitszustand einzelner Zellen eine hohe Variabilität in allen krankheitsrelevanten Parametern erwarten. Die gemessenen elektrophysiologischen Daten weisen bei den G93A hMN aber kaum einen Unterschied in der Standardabweichung des Mittelwerts im Vergleich zu wt hMN auf. Dies und die generell geringen Unterschiede in den Mittelwerten zeigen, dass alle gemessenen Zellen aus kranken Tieren sich kaum in ihren biophysikalischen und Entladungseigenschaften verändern. Ihre Aufgaben im Netzwerk können sie scheinbar noch erfüllen (muss mit *in vivo*-Messungen noch nachgeprüft werden) und isolierte elektrophysiologische Veränderungen werden nicht die Degenerationsursache sein. Aus den elektrophysiologischen Analysen ließ sich kein direkter Pathomechanismus ableiten. Ausschließen lässt sich aber nicht, dass nur gesunde oder resistente Zellen in G93A-Mäusen gemessen wurden, da evtl. nur diese den Stress der Präparation überstehen, die fluorometrischen Messungen zeigen aber deutliche Unterschiede zwischen etwa einem Drittel der analysierten G93A Zellen im Vergleich zu wt Neuronen, womit sich diese Kritik widerlegen lässt. Die Funktionstüchtigkeit der gemessenen überlebenden Motoneurone scheint trotz Störungen der Calciumhomöostase weitestgehend erhalten zu bleiben.

4.2.3 Unterschiede zwischen vulnerablen und resistenten Motoneuronen

Beim Vergleich der Motoneuronpopulationen des Ncl. Hypoglossus und des Ncl. Oculomotorius wurde eine andere Stichprobe der hMN verwendet, da die Messbedingungen für die Datenerfassung der oMN andere waren als für die Grundcharakterisierung der hMN. Bei den fluorometrischen Messungen wurden auch elektrophysiologische Daten aufgezeichnet, die für diesen Vergleich Anwendung fanden. Im Gegensatz zu den rein elektrophysiologischen Messungen waren bei den kombinierten Ableitungen die Badlösung und die Pipettenlösung modifiziert. In der Badlösung befand sich mit PPADS ein pharmakologischer Blocker für P2X-ATP-Rezeptoren, da die hMN vieler dieser ionotropen Rezeptoren exprimierten und das ATP in der Pipettenlösung zu einer starken Depolarisation der Zellen führte. P2X-Rezeptoren haben bei ATP-Bindung eine tonisch erregende Wirkung und

spielen eine große Rolle bei der Modulation inspiratorischer Aktivität der MN des Ncl. Hypoglossus [Funk et al., 1997]. Bei Testmessungen von hMN bis P14 mit einer ATP-haltigen Pipettenlösungen wurde keine Depolarisation beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die P2X-Rezeptoren erst später in der Entwicklung exprimiert werden.

Außerdem war in der Pipettenlösung statt EGTA als Calciumpuffer der calciumbindende Fluoreszenzfarbstoff Fura-2, der laut durchgeführter Kalibrierung eine etwa dreifach höhere Dissoziationskonstante als EGTA aufwies. Somit war ein größerer Anteil an freiem Calcium in den fluorometrischen Messungen vorhanden und die Signale hatten physiologischere, schnellere Kinetiken. Unterschiede in elektrophysiologischen Parametern der hMN wie ein hyperpolarisiertes Ruhepotential, eine depolarisiertere Schwelle, eine geringere cAHP-Amplitude und längere cAHP-Zeitkonstanten lassen sich mit Veränderungen calciumabhängiger Prozesse wie einer geringeren Aktivierung calciumabhängiger Kaliumkanäle durch schnellere Erholung des Calciumsignals erklären. Auch die längere Wartezeit zwischen den Stimulationsschritten veränderte die Erregungseigenschaften. Die signifikant höhere Maximalfrequenz könnte daher rühren, dass die Zellen sich zwischen den Aktivierungen auf ein stabileres Ruheniveau begeben, die Erholung des Calciumsignals komplett abgeschlossen ist und sich mehr spannungsabhängige Prozesse in einem Zustand der Aktivierbarkeit befinden. Die Zeitkonstante der Erholung des Calciumsignals von bis zu 12 s bei einem Stimulationsabstand von 5 s bei den rein elektrophysiologischen Messungen unterstützt diese These. Unterschiede zwischen wt und G93A hMN, die unter den ersten Bedingungen auftraten (Ruhepotential, AP Schwelle) konnten bei den kombinierten Messungen nicht beobachtet werden. Dies könnte an der zufälligen Auswahl der Stichprobe liegen. So waren die Zellen der kombinierten Messung auch stichprobenbedingt signifikant größer als bei den ersten Messungen. Der neu auftretende signifikante Unterschied in der cAHP Amplitude war bei den rein elektrophysiologischen Messungen nur tendenziell zu erkennen und könnte durch die unterschiedlichen Calciumpuffereigenschaften der zweiten Messreihe deutlicher geworden sein. Dieser Unterschied zwischen wt und G93A gab bereits erste Hinweise auf eine Störung der Calciumhomöostase bei G93A hMN, die anschließend mit fluorometrischen Methoden bestätigt werden konnte.

Der Vergleich der elektrophysiologischen Daten zwischen den verschiedenen vulnerablen Neuronenpopulationen zeigte deutliche Unterschiede auf. So war das Ruhemembranpotential in den resistenten oMN etwa 4 mV hyperpolarisierter, die AP Schwelle hyperpolarisierter und die Steigung der Frequenz-Strom-Kurve signifikant größer, was auf höhere Erregbarkeit mit anderer Kanalzusammensetzung aber auch auf ein stabileres Ruheniveau in den resistenten Zellen hindeutet. Auch sind oMN in der Lage schnellere Aktionspotentialfrequenzen zu generieren. Das cAHP in den oMN hatte eine signifikant kleinere Amplitude mit längeren Zeitverläufen im Vergleich zu den hMN und war nicht unterschiedlich zwischen wt und G93A. Dies könnte auf der höheren Calciumpufferkapazität beruhen.

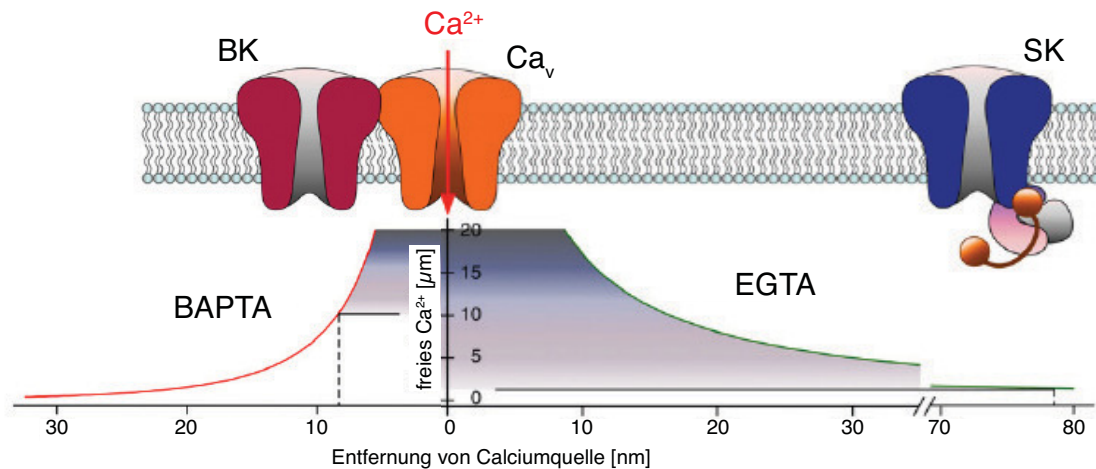


Abbildung 4.1: Aktivierung von SK- und BK-Kanälen durch unterschiedliche Calciumdomänen

BK-Kanäle sind in Nanodomänen mit Calciumquellen (spannungsabhängige Calciumkanäle, Ca_v) lokalisiert und niedrig calciumaffin, SK-Kanäle sind hoch calciumaffin und öffnen bei der Erhöhung von globalem Calcium. Die Calciumchelatoren BAPTA (bis(Aminophenoxy)-Ethan-Tetraessigsäure) und EGTA haben unterschiedliche Calciumaffinitäten und ermöglichen die Analyse der Lokalisation calciumabhängiger Kaliumkanäle. (verändert aus [Fakler and Adelman, 2008])

Diese Unterschiede in der Elektrophysiologie zwischen den vulnerablen Neuronen für die Zungenbewegung und den resistenten Neuronen für die Augenbewegung geben Hinweise auf Gründe für die differentielle Vulnerabilität, aber auch auf unterschiedliche Aktivitäts- und Integrationseigenschaften der Populationen wie die extrem schnelle Augenbewegung bei einer Sakkade im Gegensatz zu einer deutlich feiner abgestuften Zungenbewegung (siehe 4.3.2). Aus der cAHP Amplitude lassen sich Aussagen über die Calciumhomöostase von Neuronen treffen. Das cAHP wird unter anderem generiert durch die calciumabhängige Aktivierung von Kaliumkanälen vom Typ SK [Lima and Marrion, 2007]. BK-Kanäle sind eher für die schnelle Nachhyperpolarisation nach einzelnen Aktionspotentialen verantwortlich [Storm, 1989]. Es wurde gezeigt, dass BK-Kanäle in der Regel in räumlicher Nähe zu Calciumquellen in der Membran lokalisiert sind (20-50 nm) und daher bei einer lokalen Calciumerhöhung aktiviert werden. SK-Kanäle reagieren eher auf eine globale Calciumerhöhung (siehe Abb. 4.1) [Fakler and Adelman, 2008]. Auch haben diese Kanalfamilien eine unterschiedliche Calciumaffinität (deutlich höhere Calciumkonzentration nötig zur Aktivierung von BK-Kanälen als von SK-Kanälen [Xia et al., 1998; Brenner et al., 2000]) und andere Aktivierungseigenschaften (BK-Kanäle sind nicht nur calcium- sondern auch spannungsabhängig [Barrett et al., 1982; Xia et al., 1998]). Eine größere Amplitude bei G93A hMN bei angenommener gleicher Calciumbelastung der Zelle (40 Hz Stimulation) weist somit eher auf eine größere globale Calciumbelastung in vulnerablen Zellen kranker Tiere

hin, die kleineren langsamen cAHP in oMN auf eine lokal beschränkte Calciumbelastung in Zellen mit höherer Calciumpufferkapazität und folglich höherer Stressresistenz. Dieser Schluss lässt sich mit den Pufferkapazitätsmessungen in früh postnatalen oMN bestätigen [Vanselow and Keller, 2000] und bekräftigt das Argument der unterschiedlichen Calciumhomöostase als Grund für differentielle Vulnerabilität und einer Calciumüberladung als Degenerationsursache bei ALS [von Lewinski and Keller, 2005].

4.2.4 Zusammenfassung der elektrophysiologischen Charakterisierung und Ausblick

Die Charakterisierung von Motoneuronen im Gewebe adulter Mäuse hat gezeigt, dass die Entwicklung der Neurone nicht mit P10 abgeschlossen ist und die Eigenschaften bis in ein höheres Alter variabel bleiben [Mitra and Brownstone, 2011; Kutterer, 2011]. Interessant wäre eine Analyse von wt MN bei noch älteren Mäusen, um eine eventuelle Änderung aufzudecken, die durch normales Altern bedingt ist und Neurodegeneration im Alter erklären könnte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Transgen-verursachte Änderungen in juvenilen Tieren im adulten Stadium nicht mehr sichtbar sind. Zur Bestimmung einer direkten Degenerationsursache ist somit die Analyse der adulten Tiere essentiell. Allerdings konnten kaum Unterschiede in der Elektrophysiologie zwischen adulten wt und G93A hMN im Endstadium festgestellt werden, was auf eine gute Funktionstüchtigkeit der überlebenden Neurone noch im Endstadium der Krankheit hindeutet. Vergleiche zwischen vulnerablen und resistenten Populationen gaben aber Hinweise dafür, dass die Calciumhomöostase ein Grund für Degeneration und differentielle Vulnerabilität sein könnte. Dies ließ sich mit den fluorometrischen Messungen, die im Anschluss diskutiert werden sollen, bestätigen. Keine genauen Aussagen ließen sich über Subtypen, Leitfähigkeiten oder Schalteigenschaften der exprimierten Kanäle machen. Hierzu wären Einzelkanalmessungen, Analysen im *Current-Clamp*-Modus und spezifische Pharmakologie nötig. Ebenso wären Analysen der synaptischen Eingänge sowie der modulatorischen Veränderungen intrinsischer Eigenschaften wie der serotonergen Verstärkung persistierender Ströme interessant und hätten Potential für eine weiterführende Beschreibung der hMN und einer Aufklärung von Degenerationsmechanismen bei ALS.

4.3 Deutung und Einordnung der fluorometrischen Messungen

Zur weiteren Untersuchung der Hinweise aus den elektrophysiologischen Messungen auf eine veränderte Calciumhomöostase in G93A hMN wurden fluorometrische Messungen der Calciumkonzentration und -kinetik durchgeführt. Fura-2-Fluoreszenz wurde mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet, wobei eine Verlangsamung der Erholung des Calciumsignals bei hoher Calciumbelastung in G93A hMN auffiel. Bei niedriger Belastung durch eine elektrische Stimulation, die zu einer Aktionspotentialgenerierung mit einer Frequenz von 40 Hz führte, bestand kein Unterschied zwischen wt und G93A.

Auch mit dieser Methode wurden bereits in Zellkultur und an früh postnatalen Mäusen ähnliche Versuche durchgeführt (siehe 1.3.2.5), aber auch auf Populationsbasis bei adulten Tieren [Jaiswal and Keller, 2009]. Mit dem bei dieser Arbeit angewandten Stimulus einer Depolarisation von einzelnen Zellen mittels der *Patch-Clamp*-Methode sind aber keine vergleichbaren Studien publiziert. Oft wird bei Experimenten an Gewebeschnitten eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration oder die Aktivierung von AMPA-Glutamatrezeptoren als Stimulus verwendet [Grosskreutz et al., 2007; Jaiswal and Keller, 2009]. Guatteo und Kollegen konnten sogar in Motoneuronkultur zeigen, dass eine verlangsamte Erholung des Calciumsignals in G93A Zellen, wie sie auch hier bestand, nur nach Stimulation der Glutamatrezeptoren mit Kainat auftritt, nicht jedoch nach Depolarisation der Zellen um 50 mV für 25 s [Guatteo et al., 2007]. Eine Degeneration von spinalen und kortikalen Neuronen nach NMDA-Rezeptoraktivierung, nicht aber nach Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle bei gleicher Calciumbelastung [Tymianski et al., 1993; Sattler et al., 1998], bekräftigt diesen Befund einer Calciumquelle-spezifischen Problematik. Trotzdem konnte bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten elektrischen Stimulation und der hervorgerufenen Aktionspotentialgenerierung ein differentieller Effekt zwischen wt und G93A hMN beobachtet werden. Eventuell ist die Calciumbelastung der Zellen hier so groß, dass sie eine lokale domänenspezifische Konzentrationserhöhung übersteigt, die bei den anderen Studien nur durch andere Calciumquellen erreicht werden konnte. Auch Unterschiede zwischen intakten Neuronen im Hirnschnitt und dissoziierten Zellen in Kulturen könnten eine Rolle spielen.

Im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Messungen konnten bei den hier durchgeführten Calciummessungen größere Varianzen zwischen den einzelnen Zellen aus G93A-Tieren als zwischen wt Zellen beobachtet werden. Etwa ein Drittel der G93A hMN zeigten langsamere Zeitkonstanten der Erholung des Calciumsignals und größere, auf die Amplitude normierte Flächen der Calciumkurven als alle gemessenen wt Zellen. Dies weist auf die bereits diskutierten Unterschiede im Krankheitsstatus innerhalb der G93A-Population hin und bestärkt die Hypothese einer Calciumhomöostasestörung als Degenerationsursache

bei der ALS. Unterschiede in der Amplitude des Calciumsignals können auf einen höheren Calciuminflux bei gleicher elektrischer Stimulation hindeuten. Eine Analyse der Ströme durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle müsste zur Abklärung folgen. Die Unterschiede könnten auch in der schlechteren Calciumtransportkapazität begründet sein. Wenn die Extrusions- und Speichermechanismen bereits greifen bevor der maximale Influx erreicht ist, verringern diese die Amplitude des Signals. Eine Störung der Extrusion und Speicherung bei gleicher externer Calciummenge führt dann zu einer größeren Amplitude. Dieser Effekt begründet wahrscheinlich auch die generell höheren Amplituden bei allen Versuchen mit pharmakologischer Blockade einzelner Calciumtransportmechanismen.

4.3.1 Ursachen für die verlangsamte Erholung des Calciumsignals

Mit den spezifischen Blockaden einzelner Calciumtransporter sollte der Hauptbefund der verlangsamten Erholung des Calciumsignals mechanistisch aufgeklärt werden. Aufgrund der Vorbefunde bei ALS-Patienten und im Mausmodell war eine Verringerung der mitochondrialen Calciumaufnahme wahrscheinlich (siehe 1.2.3.2 und [Kawamata and Manfredi, 2010]). Die Experimente mit Entkopplung der Mitochondrien durch FCCP zur Verhinderung der mitochondrialen Calciumaufnahme während der Stimulation bestätigten diese Vermutung. Zeitkonstante und Fläche der Signale in wt hMN wurden mit FCCP unabhängig von der Stärke der Calciumbelastung etwa um das Doppelte bis Dreifache größer, was einen hohen Anteil der Mitochondrien an der Calciumspeicherung in gesunden Motoneuronen zeigt, entsprechend der Werte in der Literatur [Jaiswal and Keller, 2009]. Die hier vorherrschenden höheren Temperaturen machten den Anteil evtl. noch größer [David and Barrett, 2000]. Bei 40 Hz, also niedriger Calciumbelastung, veränderten sich die Kinetiken bei G93A hMN durch FCCP aber nicht. Mitochondrien scheinen bei niedrigen Calciumkonzentrationen in G93A Zellen nicht an der schnellen Calciumspeicherung beteiligt zu sein. Ein anderer Exportmechanismus, wie beispielsweise der Transport über die Plasmamembran, wird hieran beteiligt sein, wie von Wanaverbecq und Kollegen für andere Neuronenpopulationen beschrieben [Wanaverbecq et al., 2003]. Bei maximaler Entladungsfrequenz konnte nur eine geringe Beeinflussung der hMN durch FCCP beobachtet werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Mitochondrien während des Zeitpunktes der Neurodegeneration im ALS-Mausmodell kaum Anteil an der Calciumextrusion haben und dies zu einer Störung der Calciumhomöostase führt, die degenerationsursächlich sein könnte. Ein direkter Nachweis der Calciumkonzentrationen in Mitochondrien mit fluorometrischer Messung der Fluoreszenz von Rhod-2 [Minta et al., 1989] oder genetisch codierter mitochondrienspezifischer Calciumindikatoren [Rizzuto et al., 1992] könnte zur Bestätigung des Befundes noch ergänzt werden.

Bei den Experimenten wurde eine relativ niedrige Konzentration von 200 nM FCCP verwendet. Diese Konzentration wird vermutlich die Mitochondrien nicht komplett entkop-

peln, was auch durch Vorversuche für die Mitochondrienpotentialmessungen gezeigt werden konnte. Es ist möglich, dass G93A-Mitochondrien wegen einer Vorschädigung weniger auf diesen Entkopplungsversuch reagierten als gesunde Zellen, weiterhin Calcium aufnehmen konnten und sich deshalb die Parameter kaum veränderten. Das mit den Rh123-Analysen gezeigte intakte Membranpotential macht dies aber unwahrscheinlich. Eben dieser Befund steht allerdings im Kontrast zu bereits veröffentlichten Studien, die im Zellkulturmodell [Carri et al., 1997] aber auch im Ncl. Hypoglossus bei adulten G93A-Mäusen eine Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials nachweisen konnten [Jaiswal and Keller, 2009]. Eine Erklärungsmöglichkeit für diese Diskrepanz wäre, dass bei der vorliegenden Arbeit nur Zellen gemessen werden konnten, die intakte Mitochondrien hatten und alle anderen Zellen der Analyse entgingen. In der Vergleichsstudie wurde die Fluoreszenz über dem kompletten Schnitt gemessen, nicht über einzelnen Zellen. Eine Analyse der Rh123-Fluoreszenz bei der vorliegenden Arbeit zeigte aber auch keine Unterschiede zwischen dem Gewebe von Wildtyp- und G93A-Mäusen, so dass diese Kritik abgewiesen werden kann. Möglich wäre noch eine höhere Anzahl depolarisierter Mitochondrien, die insgesamt die gleiche Menge Rh123 aufnehmen könnten. Dies wäre durch histologische Färbungen von Mitochondrien in Wildtyp- und G93A-Hirnschnitten untersuchbar. Generell ist die Rh123-Fluoreszenzmessung aber nur ein indirektes Maß für das mitochondriale Membranpotential und in einer komplexen Schnittpräparation müssen die hier erbrachten Befunde noch anderweitig bestätigt werden.

4.3.1.1 Verringerung der Transportleistung des mitochondrialen Calciumuniporters als Ursache der mitochondrialen Störung

Eine Störung der Calciumaufnahme in die Mitochondrien wegen einer geringeren Triebkraft bei den hier durchgeführten Experimenten ist mit den Ergebnissen der Rh123-Messungen eher unwahrscheinlich. Der wichtigste Transporter für Calcium in den Mitochondrien ist der mitochondriale Calciumuniporter (mCU), der durch Ru360 blockierbar ist. In Neuronen des sympathischen Nervensystems konnte gezeigt werden, dass ein schneller Import von Calcium in Mitochondrien durch diesen Aufnahmeweg vor allem in der Phase der höchsten Calciumbelastung vorhanden ist (siehe Abb. 4.2c) [Colegrove et al., 2000]. Dies lässt sich auch mit der niedrigen Calciumaffinität des Transports in Einklang bringen [Kirichok et al., 2004]. Dementsprechend kann man das auftretende Fluoreszenzplateau bei Ru360 Blockade in den bei der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten erklären. Ein Ausschalten des mCU und somit einer frühen schnellen Calciumaufnahme in die Mitochondrien führte zu einer konstant hohen Calciumkonzentration in den Zellen bei Beendigung des Stimulus, die nur langsam durch andere Mechanismen verringert werden konnte. Bei 40 Hz konnte weder bei G93A hMN noch im Wildtyp eine Veränderung der Calciumhomöostase durch die Transporterblockade beobachtet werden. Vermutlich ist die Calciumerhöhung durch

diesen geringen Stimulus zu klein, um den mCU zu aktivieren. Im wt ist jedoch wahrscheinlich ein anderer, hier nicht identifizierbarer, mitochondrialer Aufnahmemechanismus vorhanden, da die Ausschaltung der Mitochondrien durch FCCP eine Veränderung ergab. Bei hoher Calciumbelastung trat das Plateau sowohl bei wt als auch bei einigen G93A Zellen auf. Jedoch war die Fläche der Calciumkurve nur bei wt hMN signifikant größer nach Ru360 Blockade und die Werte für wt und G93A glichen sich an. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Störung der mitochondrialen Calciumaufnahme durch eine Verringerung der Transportkapazität des mitochondrialen Uniporters zustande kommt und die G93A hMN andere Mechanismen zur Erholung des Calciumsignals bevorzugen. Eventuell ist die Expression einer Untereinheit dieses Transporters verringert oder modulatorische Mechanismen wurden aufgrund des Zellstress verändert. UCP3 wird als modulatorische Untereinheit des mCU diskutiert [Trenker et al., 2007] und eine Expressionserhöhung in Muskelgewebe konnte bei ALS-Patienten und im Mausmodell bereits gezeigt werden [Dupuis et al., 2003]. Eine Analyse der Expression und Funktion bei der Calciumhomöostase in Motoneuronen bei ALS fehlt aber.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre noch, dass zwar Triebkraft und Leitfähigkeit für Calcium bei wt und G93A primär gleich sind, dass aber in G93A hMN schon durch eine geringe Calciumaufnahme die Triebkraft sehr viel geringer wird, dadurch, dass die Mitochondrien stark depolarisieren und somit eine weitere Calciumaufnahme verhindert wird. Eine größere Potentialänderung bei Calciumeinstrom als im Wildtyp wurde bereits an der neuromuskulären Endplatte in G93A-Mäusen gezeigt [Nguyen et al., 2009] und müsste bei der Hirnstammpräparation noch untersucht werden. Vorversuche zeigten aber keine wesentliche Änderung der Rh123-Fluoreszenz bei den elektrischen Stimulationen, wahrscheinlich aufgrund technischer Probleme, die die Registrierung sehr kleiner Fluoreszenzänderungen nicht erlaubte oder weil die Calciumbelastung nach und nach erfolgte, was weniger Potentialänderung hervorruft [Chalmers and Nicholls, 2003]. Letzteres würde das Argument für eine potentialbedingte verringerte mitochondriale Calciumaufnahme abschwächen.

4.3.1.2 Der mitochondriale Natrium-Calcium-Austauscher transportiert Calcium in Mitochondrien

Von Colegrove und Kollegen konnte weiterhin gezeigt werden, dass der mitochondriale Natrium-Calcium-Austauscher (mNCX) in einer späteren, der Aktivität des mCU folgenden Phase der Erholung des Calciumsignals aktiv ist [Colegrove et al., 2000]. In den von dieser Gruppe analysierten Neuronen führte der mNCX zu einem Plateau im mittleren Drittel der Kurve, das bei Blockade verschwand (siehe Abb. 4.2b). Wenn der mNCX in dieser Phase Calcium aus den Mitochondrien in das Zytoplasma transportiert, steht diese Calciumerhöhung im Gleichgewicht zu einer Calciumerniedrigung durch Extrusion über die Plasmamembran und Transport in das ER und ein Plateau entsteht. Ein solcher Effekt

konnte in den Motoneuronen nicht beobachtet werden. Es war im Gegenteil eine Verlangsamung der Signalerholung nach Blockade zu sehen. Dies weist darauf hin, dass der mNCX in diesen Zellen unter den verwendeten Bedingungen Calcium in die Mitochondrien transportiert, statt aus diesen heraus. Diese Transportrichtung verlangt entweder eine Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials oder eine hohe intramitochondriale Natriumkonzentration bei niedriger zytoplasmatischer [Chinopoulos and Adam-Vizi, 2010]. In der Pipettenlösung befand sich als einzige Natriumquelle das Natriumsalz von ATP mit einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$. Das mitochondriale Membranpotential ließ sich zwar mit den Rh123-Messungen nicht quantitativ beschreiben, eine massive Depolarisation ist aber unwahrscheinlich, da eine deutliche Rh123-Fluoreszenzerhöhung bei Entkopplung beobachtet werden konnte. In der inneren Mitochondrienmembran befindet sich ein Natrium-Protonen-Austauscher, der für den Export von Natrium in die Mitochondrienmatrix verantwortlich ist auf Kosten von Protonenverlust und Depolarisation [Numata et al., 1998]. Dieser ist bei ischämischen Zuständen in seiner Aktivität gestört, was zu einer Umkehr der Transportrichtung des mNCX führt [Smets et al., 2004; Castaldo et al., 2009]. Ein ähnlicher durch die experimentellen Bedingungen verursachter Zustand wäre hier als Erklärung der ungewöhnlichen Transportrichtung auch denkbar.

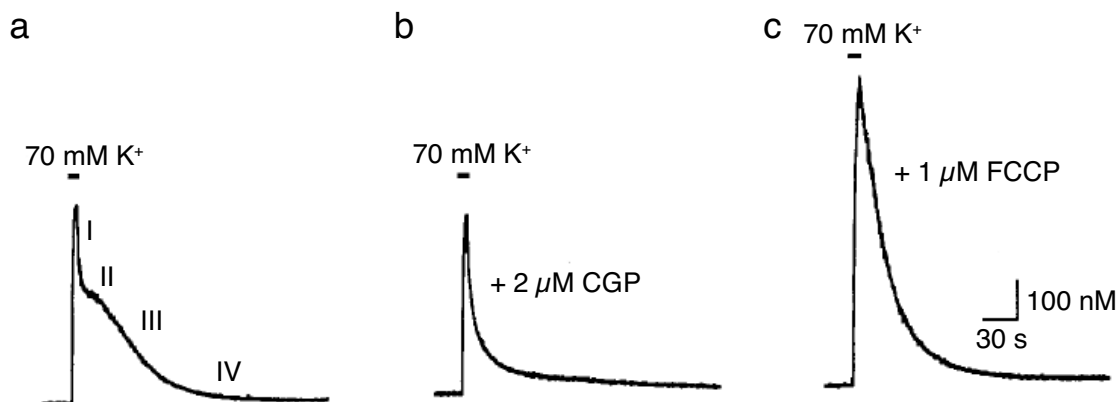


Abbildung 4.2: Verschiedene Transporter bestimmen die Phasen der Erholung des Calciumsignals

(a) In Neuronen des Sympatikus lassen sich nach Depolarisation der Zellen mit einer hohen Kaliumkonzentration vier Phasen der Erholung erkennen. (b) Nach Blockade des mNCX mit CGP37157 verschwindet die Plateauphase (II), die durch ein Gleichgewicht des Transports von Calcium in das Zytoplasma mit dem mNCX und der Extrusion über die Plasmamembran entsteht. Letztere überwiegt dann in Phase III und VI. (c) Durch eine Entkopplung von Mitochondrien durch FCCP verschwindet auch die erste Phase (I), die dementsprechend einer schnellen Aufnahme von Calcium in die Mitochondrien entspricht. (verändert aus [Colegrove et al., 2000])

Es war weder bei wt noch bei G93A Neuronen eine signifikante Änderung der Signalfäche bei mNCX-Blockade zu beobachten, weswegen dieser Transportmechanismus bei der Beschreibung der Degenerationsursachen im ALS-Mausmodell vernachlässigbar ist. Eine Calciumaufnahme in die Mitochondrien durch den mNCX statt einer Abgabe könnte die Motoneurone aber spezifisch vulnerabel für eine Calciumüberladung der Mitochondrien und somit extrem anfällig für exzitotoxische Stimuli machen.

4.3.1.3 Die Rolle der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore bleibt unklar

Histologische Nachweise von geschwollenen Mitochondrien weisen auf ein Öffnen der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mPTP) bei ALS hin [Martin et al., 2009]. Auch wurde gezeigt, dass die Blockade der Öffnung der mPTP in Motoneuronen bei exzitotoxischem Stimulus protektiv sein kann [Martin, 2011]. Dieser Notmechanismus bei Calciumüberladung von Mitochondrien wäre eine Degenerationsursache, eine Öffnung der mPTP nach Stimulation im ALS-Mausmodell konnte schon gezeigt werden [Nguyen et al., 2011]. Mit Cyclosporin A (CsA) kann man eine Öffnung der mPTP verhindern und es sollte damit herausgefunden werden, ob unter den bei dieser Arbeit verwendeten Bedingungen eine Öffnung stattfand. Bei 40 Hz war mit CsA kein Unterschied zu Kontrollmessungen zu erkennen. Diese geringe Calciumbelastung reicht sehr wahrscheinlich nicht für eine Überladung der Mitochondrien aus. CsA führte bei Maximalfrequenz zu einer Verringerung der Signalfäche bei G93A hMN, was mit einer Blockade der Öffnung zu vereinbaren wäre. Es ist möglich, dass unter Kontrollbedingungen eine Calciumüberladung geschädigter Mitochondrien stattfindet, die zu einer Öffnung der mPTP führt. Eine Calciumfreisetzung durch die Pore würde dann die langsameren Erholungskinetiken unter Kontrollbedingungen erklären. Die signifikant größere Fläche bei wt hMN lässt sich aber nicht mit einer Wirkung von CsA auf die mPTP vereinbaren. CsA ist ein unspezifisches Immunsuppressivum, das auch die Phosphatase Calcineurin blockiert, einen Modulator von spannungsabhängigen Calciumkanälen [Xu et al., 2010]. Dies könnte den Effekt auf die wt Zellen verursachen. Auch ist CsA nicht immer effektiv bei der Blockade der Öffnung [He and Lemasters, 2002]. Aufgrund der unzureichenden Spezifität sind die Ergebnisse der G93A Zellen somit fragwürdig. Eine Studie zum Beispiel mit Cyclophilin-*knock-out*-Mäusen, bei denen die mPTP nicht öffnet [Baines et al., 2005], müsste zur endgültigen Klärung des Beitrags der mPTP an der Motoneurondegeneration folgen.

4.3.1.4 Das Endoplasmatische Retikulum trägt nur einen kleinen Anteil zu der Calciumspeicherung bei

Neben den Mitochondrien ist das Endoplasmatische Retikulum der zweite intrazelluläre Calciumspeicher. Diese Calciumspeicherung wird mit Thapsigargin, einem Blocker der

SERCA, verhindert und so konnte der Anteil des ER an der Calciumspeicherung der Motoneurone untersucht werden. Auch hier war bei 40 Hz kein Effekt der Blockade zu erkennen. Bei niedrigen Calciumkonzentrationen ist eine Beteiligung des ER an der Erholung des Calciumsignals somit unwahrscheinlich. Aber auch bei hoher Calciumbelastung gab es keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollmessungen. Das ER hat somit unter den hier vorhandenen Bedingungen kaum Anteil an der Calciumhomöostase weder in wt noch in G93A hMN. Dieser Befund stimmt überein mit ähnlichen Messungen von hMN früh postnataler und adulter Mäuse [Balakrishnan, 2006; Jaiswal and Keller, 2009]. Allerdings nimmt unter Thapsigargin bei Maximalfrequenz die Signalfäche bei wt hMN tendenziell zu, bei G93A hMN eher ab. Mit dem Hintergrund des gezeigten mitochondrialen Phänotyps wäre eine Erklärungsmöglichkeit in der ER-Mitochondrien-Kopplung zu suchen. Im Ncl. Hypoglossus konnte gezeigt werden, dass mitochondriales Calcium sehr stark zur Füllung des ER in Motoneuronen beiträgt [Ladewig et al., 2003]. Bei wt Zellen kann bei SERCA-Blockade weder das externe Calcium noch das aus den Mitochondrien wieder freigesetzte in das ER aufgenommen werden. Die zytosolische Calciumkonzentration bleibt, wie bei der hier gezeigten Messung, länger erhöht. Es wird bei ER Blockade vermehrt Calcium in Mitochondrien gespeichert [Pozzo-Miller et al., 1997], nach und nach in Zytosol freigesetzt und nur langsam über die Plasmamembran endgültig entfernt. Bei G93A hMN wäre denkbar, dass ohne Blockade ein Teil des einfließenden Calciums in das ER aufgenommen wird und langsam über RyR und IP₃R wieder in das Zytosol gelangt, was die Kinetiken verlängert. Bei einer SERCA-Blockade würde nun weder Calcium in die geschädigten Mitochondrien noch in das ER aufgenommen, sondern alles über die Plasmamembran transportiert. Eine signalvergrößernde sekundäre Calciumfreisetzung aus dem ER könnte so nicht stattfinden und die Signalfäche wäre, wie gezeigt, kleiner als ohne Blockade. Beachtet werden muss außerdem, dass Thapsigargin in den hier verwendeten Konzentrationen auch spannungsabhängige Calciumkanäle hemmt [Shmigol et al., 1995] und die tatsächliche Calciumkonzentration somit evtl. nicht mit denen bei den anderen Messungen vergleichbar ist.

4.3.1.5 Der Calciumtransport über die Plasmamembran ist bei G93A hMN wahrscheinlich gesteigert

Die Daten aus Messungen, bei denen sowohl mit FCCP die mitochondriale Calciumaufnahme, als auch mit Thapsigargin die SERCA blockiert wurde, zeigen, dass auch in G93A hMN die intrazelluläre Calciumspeicherung eine Rolle spielt. Vor allem bei geringer Calciumbelastung verlangsamt sich die Erholung des Calciumsignals enorm, wenn beide Organellen ausgeschaltet sind, was bei den einzelnen Blockaden so nicht vorherzusehen war. Evtl. übernimmt der eine Calciumspeicher die Aufgabe des anderen bei dessen Blockade. Deutlicher ist die Störung der Calciumhomöostase bei wt Zellen durch die doppelte Blockade. Sowohl

bei 40 Hz als auch bei Maximalfrequenz ist die Erholung des Calciumsignals bei wt hMN langsamer mit größerer Signalfäche als bei G93A hMN. Der Unterschied bei hoher Calciumbelastung zwischen Kontrollbedingungen und doppelter Blockade ist nur bei wt hMN signifikant. Es gibt leider keine spezifischen, unter diesen experimentellen Bedingungen verwendbaren Blocker für die Plasmamembran-Calciumtransporter PMCA und NCX. Somit lässt sich aus den Ergebnissen nur indirekt schließen, dass diese Transporter bei G93A hMN eine größere Rolle bei der Calciumextrusion spielen als bei wt Zellen. Dies könnte ein Kompensationsmechanismus der kranken Zellen sein, um die mangelhafte mitochondriale Calciumaufnahme auszugleichen und somit die Motoneurone bei Calciumbelastungen vor einer Calciumüberladung zu schützen. Während der Messungen konnte beobachtet werden, dass die wt hMN deutlich instabiler bei doppelter Blockade waren als die G93A hMN. Auch das ist ein Hinweis dafür, dass die G93A Zellen durch Kompensationsmechanismen besser auf einen Ausfall von intrazellulären Calciumspeichern reagieren können. Für sehr hohe Calciumbelastungen ist dieser Mechanismus aber zu langsam oder zu früh gesättigt, so dass die hier bei Maximalfrequenz beobachtete langsamere Erholung des Calciumsignals erklärbar wird. Eine Aktivitätssteigerung und Expressionserhöhung der PMCA bei einer Blockade der SERCA und folgende langsamere Calciumkinetiken konnten bereits in mehreren Zelltypen gezeigt werden [Kuo et al., 1997; Pottorf et al., 2000; Pottorf and Thayer, 2002]. Eine ähnliche Reaktion bei mitochondrialer Fehlfunktion ist wahrscheinlich.

4.3.2 Unterschiede zwischen vulnerablen und resistenten Motoneuronen

Wenn die verringerte mitochondriale Calciumaufnahme eine Ursache für die Neurodegeneration bei ALS ist, dürften in den resistenten Neuronen des Ncl. Oculomotorius die verlangsamten Kinetiken der Erholung nicht sichtbar sein. In der Tat zeigten die Vergleiche der Calciumsignale nach Stimulation zwischen hMN und oMN eine signifikant geringere Zeitkonstante und Signalfäche bei G93A oMN. Der Unterschied zwischen wt und G93A war bei Motoneuronen des Ncl. Oculomotorius nicht sichtbar, diese Neurone haben keine Störung der Erholung des Calciumsignals. Dieser Befund bestärkt die Hypothese einer Calciumüberladung der hMN als subtypspezifische Degenerationsursache bei ALS.

Zusätzlich konnte aus den Werten aber auch geschlossen werden, dass die oMN generell andere Calciumkinetiken aufweisen. Bei niedriger Calciumbelastung waren Zeitkonstante und Signalfäche sowohl bei wt also auch bei G93A tendenziell größer als bei hMN. Dies ist vereinbar mit der gezeigten höheren Calciumpufferkapazität der oMN [Vanselow and Keller, 2000] und ist somit ein Grund für die höhere Resistenz dieser Population.

Es gibt Hinweise aus Versuchen vor allem in Primaten und Katzen sowie aus Computersimulationen, dass Neurone des Ncl. Oculomotorius Signale empfangen, die zeitlich integriert wurden [Moschovakis, 1997]. Physiologische Anwendung ist die Generierung von Sakkaden, also schnellen Augenbewegungen zu einem bestimmten Punkt und dann dessen Fixierung.

Eine Integration der Eingänge ermöglicht die Verrechnung und die präzise Antwort mit stabiler Haltefunktion am Zielort. Die hohe Calciumpufferkapazität der oMN sowie eine extrem hohe Maximalfrequenz könnte diese Funktion unterstützen. Eine Augenbewegung kann schnell durch hochfrequente Entladung veranlasst werden und die Aktivität bleibt in den Neuronen durch den langsamen Calciumkonzentrationsabfall bei hoher Pufferkapazität lange gespeichert. Durch diese Speicherung ist es möglich, weitere geringere Eingänge energiesparend aufzusummieren und es muss keine komplett neue Aktivierung veranlasst werden. Im Gegensatz dazu unterstützt die geringe Calciumpufferung in hMN eine flexible Anpassung und fein abgestufte Bewegung ohne Halteaufgaben, die für filigrane Zungenbewegungen z.B. für die Artikulation nötig ist [Ladewig et al., 2003]. Die Auswirkung einer veränderten Expression von Calciumpufferproteinen wurde an einer *knock-out*-Maus für Calbindin-D28K gezeigt, die deutliche motorische Koordinationsprobleme wegen einer Störung der Kleinhirnfunktion aufweist [Barski et al., 2003].

Die höhere Entladungsfrequenz der oMN lässt sich auch bei *in vivo*-Messungen der entsprechenden Axone oder innervierten Muskeln beobachten. So konnte in Primaten eine mittlere Entladungsfrequenz der oculomotorischen Neurone von 337 Hz mit hoher Variabilität (150-620 Hz) gemessen werden [Robinson, 1970]. Aufzeichnungen eines Elektromyogramms der Zunge beim Menschen ergab maximale Frequenzen von nur 28 Hz während der Bewegung, die für ein Freihalten der Atemwege ständig nötig ist [Saboisky et al., 2007]. Bei der Ratte wurden während der Inspiration rhythmische Entladungen mit einer Frequenz innerhalb der einzelnen Gruppen von 40-50 Hz im M. Genioglossus gemessen [Rice et al., 2011]. Auch bei den hier für die Calciumkinetiken analysierten Frequenzen wurde die 40 Hz Stimulation zum Vergleich mit den Maximalfrequenzen ausgewählt als eine Belastung, die wohl weitestgehend einer ständig wiederkehrenden physiologischen Aktivität entspricht. Zukünftig wäre es interessant, die genauen *in vivo*-Aktivitäten der zwei Kerne während physiologischer Bewegungen in der Maus zu untersuchen. Diese Aktivitätseigenschaften könnten dann im Hirnschnitt den Zellen als Stimulation vorgegeben und die Calciumsignale beobachtet werden.

Die hier verwendete 40 Hz-Stimulation für eine Sekunde führte zu einem Calciumsignal mit einer Dauer von etwa 6 s bis zur vollständigen Erholung im Ncl. Hypoglossus, wobei Fura-2 die physiologische Signalerholung etwas verzögert [Klingauf and Neher, 1997]. Bei einer Atemfrequenz von etwa 2-3 Hz in der Maus, also einer ungefähren Entladungsdauer von ca. 200 ms mit 40 Hz könnte sich ein Calciumsignal gerade erholen [Ladewig and Keller, 2000]. Ist nun die Erholung des Signals wie gezeigt bei G93A hMN verlangsamt, wäre eventuell die normale ständige physiologische Aktivität schon ein Grund für eine toxische Calciumüberladung der Zellen, die diese Integration des Calciums im Gegensatz zu oMN nicht puffern können. Dies gilt es zu beweisen, um die Relevanz der Daten, gewonnen aus unphysiologisch starken Calciumbelastungen, zu sichern. Auch eine direk-

te *in vivo*-Messung der Calciumsignale während physiologischer Aktivität wäre denkbar und würde die real auftretenden Calciumdynamiken darstellen [Garaschuk and Konnerth, 2010]. Dieser Ansatz könnte die Hypothesen der *in vitro*-Messungen einer calciumbedingten Neurodegeneration bei ALS stützen, wenn *in vivo* ein Aufsummieren des Calciums oder eine akut hohe Calciumbelastung auftritt, die nicht mehr kompensiert werden kann. Um eine gut kompensierte mitochondriale Schädigung der oMN auszuschließen, wurde auch hier eine Entkopplung der Mitochondrien mit FCCP vorgenommen und die Calciumsignale nach Stimulation gemessen. Auffällig war, dass mit der bei hMN gewählten FCCP-Konzentration von 200 nM, die eine stabile Messung der hMN über mehr als eine Stunde erlaubte, sowohl wt als auch G93A oMN zu instabil für eine *Patch-Clamp*-Messung waren. Deshalb wurde eine geringere Konzentration von 80 nM verwendet. Diese erlaubte eine stabile Messung, führte aber zu einer geringeren Entkopplung der Mitochondrien. Eine Änderung der Calciumkinetiken war jedoch sichtbar. Im Gegensatz zu hMN verlangsamte sich die Zeitkonstante der Erholung des Calciumsignals bei G93A oMN signifikant und sogar stärker als bei wt oMN. Eine kompensierte mitochondriale Schädigung ist somit unwahrscheinlich. Eventuell ist aber die mitochondriale Calciumaufnahme bei oMN essentieller für eine Funktionstüchtigkeit als bei hMN. G93A oMN reagieren etwas stärker auf die Entkopplung als wt oMN. Eine Beeinflussung der Mitochondrienfunktion durch die mutierte SOD1 kann nicht ausgeschlossen werden.

Vulnerabler als die hMN im verwendeten Modell sind die Motoneurone im Spinalmark (siehe 1.2.6.2). Die Bistabilität mit großen persistierenden Calciumströmen [Hounsgaard and Kiehn, 1989] und unterschiedliche biophysikalischen Eigenschaften (siehe 4.2.1) könnten zu einer generell höheren Calciumbelastung während physiologischer Aktivität führen. Die Calciumpufferkapazität der spinalen MN ist ähnlich gering wie die der hMN [Palecek et al., 1999]. Eine Ausweitung der hier angewandten Analysen auf spinale Motoneurone im ALS-Mausmodell ist zur Generalisierung der aufgestellten Degenerationshypothesen nötig und könnte weitere Mechanismen differentieller Vulnerabilität aufdecken.

4.3.3 Die Störung der Calciumhomöostase ist spezifisch für das Endstadium der ALS

Im Rahmen einer Ergänzung zu ihrer Diplomarbeit generierte Sylvie Kutterer mit vergleichbaren experimentellen Bedingungen unter meiner Anleitung auch fluorometrische Daten in präsymptomatischen Mäusen um P70. Diese sollen im Folgenden mit den Daten der Tiere im Endstadium verglichen werden, um eine Einschätzung des Zeitverlaufs der Calciumhomöostasestörung zu ermöglichen. In Abb. 4.3 sind die Daten der Kontrollmessungen aus den älteren Tieren denen von P70 gegenübergestellt. Die Amplituden der Calciumsignale bei P70 Tieren sind signifikant größer als bei den älteren Tieren ohne Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen. Grund könnte eine generelle altersabhängige Verringerung von Calciumströmen sein. Zeitkonstante und Fläche der Signale bei niedriger Stimulationsfrequenz sind sowohl bei wt als auch bei G93A P70 Zellen größer als bei P130 Tieren. Eine mit dem Alter geringere Calciumpufferkapazität wäre eine Erklärungsmöglichkeit. Sowohl die Verringerung von Calciumströmen als auch die der Calciumpufferkapazität mit dem Alter ist umstritten. Es gibt Veröffentlichungen, die diese zeigen, aber auch Studien, die das Gegenteil darstellen [Thibault et al., 1998]. Die Entwicklung in den hMN müsste zur Abklärung über eine umfassendere Altersstudie untersucht werden.

Die bei Maximalfrequenz beobachtete verlangsamte Erholung des Calciumsignals bei G93A Tieren im Endstadium konnte bei P70 nicht beobachtet werden. Hier unterschieden sich wt und G93A Zellen nicht signifikant. Die tendenziell geringeren Werte bei P70 G93A hMN könnten auf eine bereits beginnende Kompensation einer mitochondrialen Schädigung durch Leistungssteigerung der Plasmamembrantransporter hindeuten, die in diesem Alter noch überkompensiert ist. Zur Betrachtung des mitochondrialen Anteils der Calciumspeicherung zum präsymptomatischen Zeitpunkt wurden auch hier Versuche mit dem Entkoppler FCCP durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.4 dargestellt.

Durch die Entkopplung wurden sowohl die Zeitkonstanten als auch die normierten Signalflächen wie bei den älteren Tieren größer, allerdings bei P70 auch bei G93A hMN. In diesem präsymptomatischen Stadium sind die Mitochondrien der G93A Tiere somit noch an der Calciumspeicherung beteiligt, bei niedriger Calciumbelastung sogar stärker als wt hMN. Dieser Unterschied zwischen wt und G93A könnte darauf hinweisen, dass präsymptomatisch die Mitochondrien in dem ALS-Modell stärker mit Calcium beladen werden, was zu einer Schädigung oder kompensatorischen Gegenwirkung führen könnte.

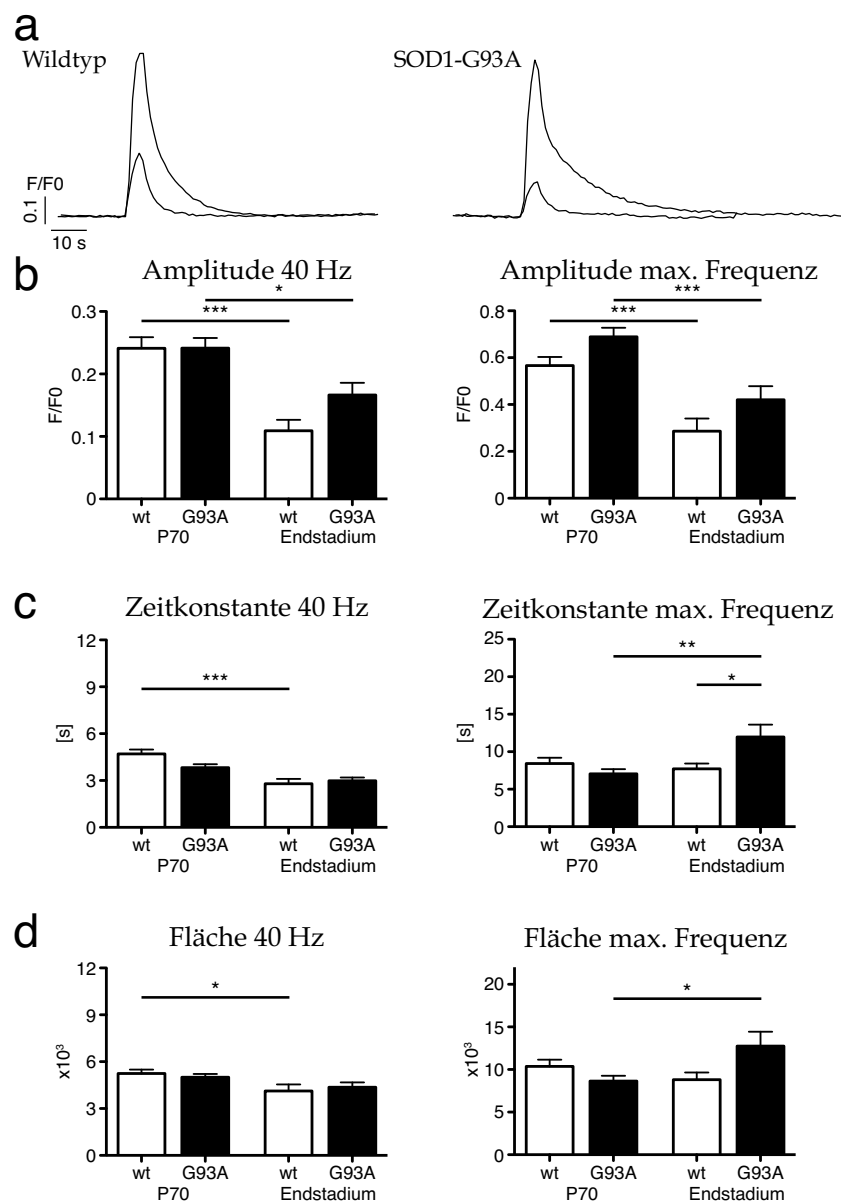


Abbildung 4.3: Keine Calciumhomöostasestörung um P70

Vergleich der Daten aus fluorometrischen Calciummessungen von Tieren im Alter um P70 und Tieren im Alter um P130. Die Calciumhomöostasestörung ist im präsymptomatischen Stadium noch nicht sichtbar. (a) Repräsentative Fura-2-Fluoreszenzkurven nach Stimulation mit 40 Hz und Maximalfrequenz von wt und G93A hMN aus Tieren mit einem Alter um P70. (b) Signalamplituden sind signifikant größer als bei P130. (c) Die Zeitkonstanten sind um P70 nicht unterschiedlich zwischen wt und G93A, aber größer als bei P130. (d) Die Flächen der Kurven bei P70 sind nicht unterschiedlich zwischen wt und G93A. Tukey Post-Hoc-Test nach ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; wt P70: $n=34$, $N=6$; G93A P70: $n=26$, $N=3$

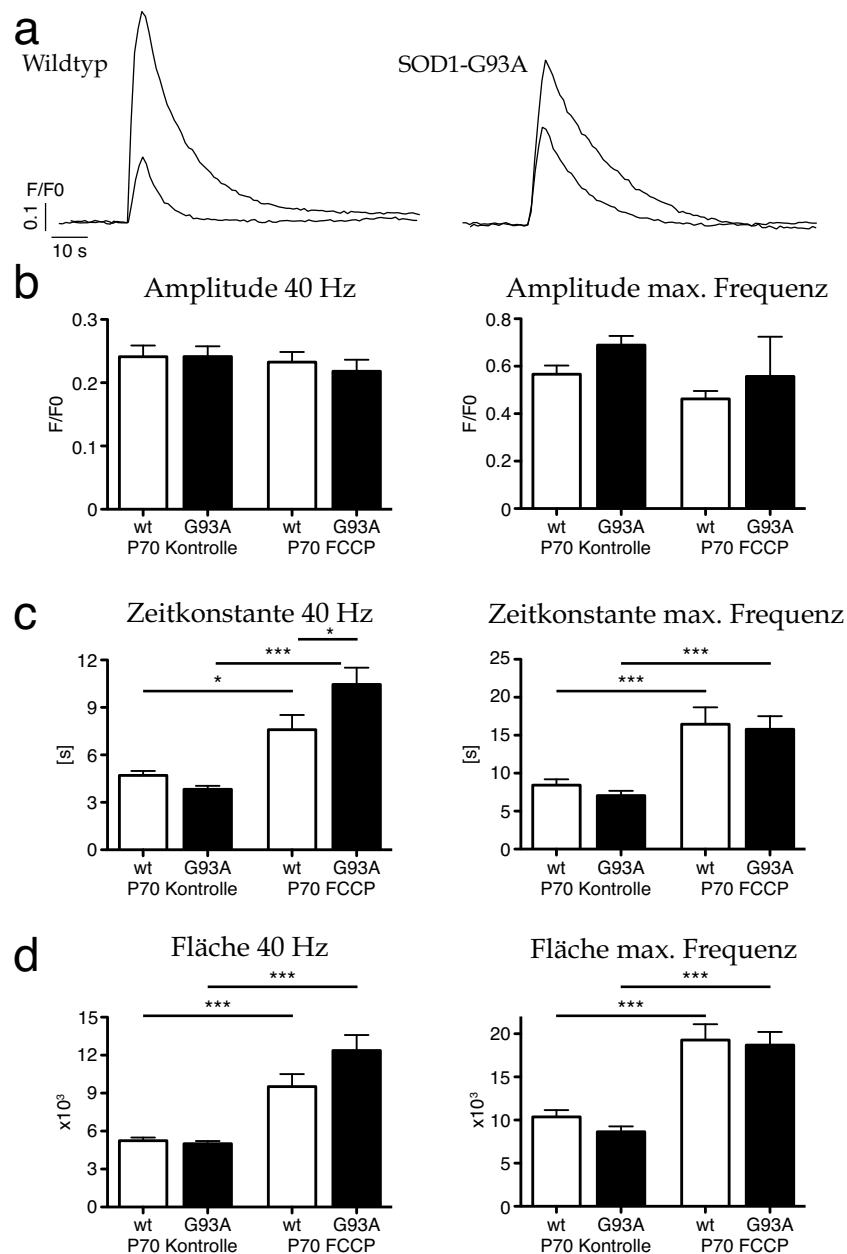


Abbildung 4.4: Entkopplung der Mitochondrien von Tieren um P70

Vergleich der Daten aus fluorometrischen Calciummessungen von Tieren im Alter um P70 mit und ohne 200 nM FCCP. Mitochondrien aus G93A Tieren in einem präsymptomatischen Stadium reagieren stärker auf Entkopplung als wt Zellen. (a) Repräsentative Fura-2-Fluoreszenzkurven nach Stimulation mit 40 Hz und Maximalfrequenz von wt und G93A hMN aus Tieren mit einem Alter um P70 mit 200 nM FCCP. (b) Signalamplituden ändern sich nicht durch die Entkopplung der Mitochondrien. (c) Die Zeitkonstanten sind sowohl bei 40 Hz als auch bei Maximalfrequenz genotypunabhängig größer bei Entkopplung. Bei 40 Hz reagieren die G93A hMN mit P70 deutlich stärker als die wt hMN. (d) Die Flächen der Kurven bei P70 sind nach Entkopplung signifikant größer, wieder ausgeprägter bei G93A bei 40 Hz. Tukey Post-Hoc-Test nach ANOVA: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; wt P70 FCCP: $n=23$, $N=4$; G93A P70 FCCP: $n=25$, $N=4$

4.4 Zusammenfassung der postulierten Degenerationsmechanismen und Therapieansätze

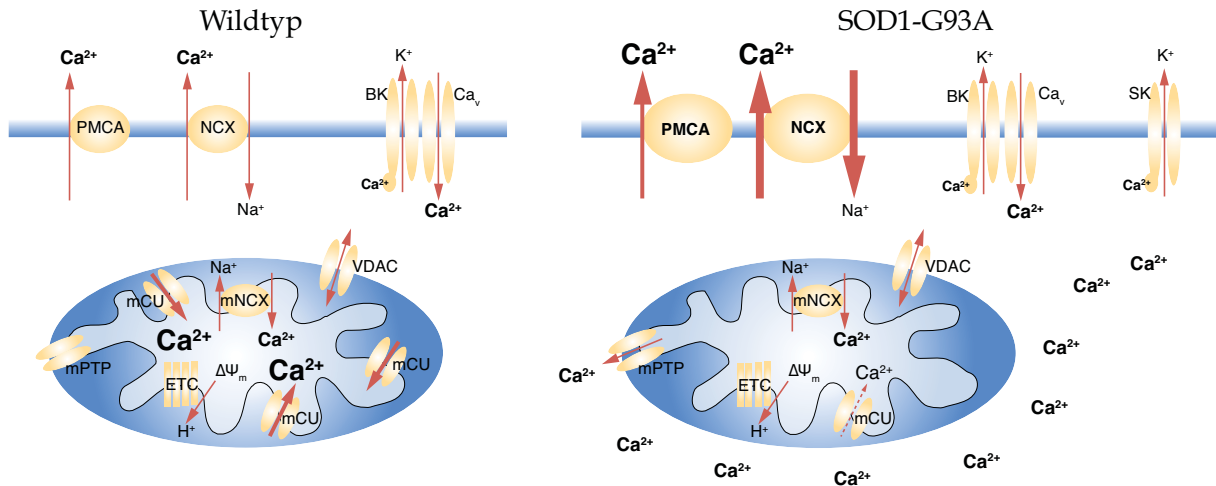


Abbildung 4.5: Zusammenfassung der Ergebnisse

Graphische Veranschaulichung der möglichen Schlüsse aus den fluorometrischen und elektrophysiologischen Messungen. In wt hMN aktiviert Calcium durch spannungsabhängige Calciumkanäle (Ca_v) BK-Kaliumkanäle in unmittelbarer anatomischer Nähe zur Quelle [Fakler and Adelman, 2008]. Freies Calcium wird in Mitochondrien gespeichert oder über die Plasmamembran exportiert. In G93A hMN im Endstadium ist die Calciumaufnahme in Mitochondrien durch weitestgehenden Funktionsverlust des mitochondrialen Calciumuniporters (mCU) verringert. Das mitochondriale Membranpotential kann somit stabil gehalten werden. Kompensatorisch sind die Plasmamembrantransporter (Plasmamembran Calcium-ATPase (PMCA) und Natrium-Calcium-Austauscher (NCX)) hochreguliert, die aber eine Calciumüberladung final nicht verhindern können. Die globale zytosolische Calciumerhöhung aktiviert SK-Kanäle. Evtl. kommt es zusätzlich im späten Stadium zu einer Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore (mPTP). ETC=Elektronentransportkette, mNCX=mitochondrialer Natrium-Calcium-Austauscher, VDAC=spannungsgesteuerter Anionenkanal

Der Hauptbefund der vorliegenden Arbeit ist die Verlangsamung der Erholung des Calciumsignals bei hoher Calciumbelastung. Diese Verlangsamung ist für das Endstadium der Krankheit bei vulnerablen hMN spezifisch und kommt durch den Wegfall der Calciumaufnahme in die Mitochondrien zustande. Letzterer ist mit einer verringerten Transportleistung des mitochondrialen Calciumuniporters bei ursprünglich gleicher Triebkraft erklärbar. Partiiell kompensiert wurde dieser Mangel wahrscheinlich durch verstärkten Transport von Calcium über die Plasmamembran, der aber bei hoher Belastung für eine schnelle Calciumextrusion nicht ausreichte. Die Veränderung der cAHP-Amplitude durch verstärkte Aktivierung calciumabhängiger Kaliumkanäle vom Typ SK ist die folgende elektrophysiologische Konsequenz, was *in vivo* zu einer Verringerung der Aktionspotentialgenerierung während repetitiver Entladung führen kann [Lape and Nistri, 2000]. Dies wäre zellprotektiv und würde die tendenziell geringere Erregbarkeit von G93A hMN erklären. Dieser Schluss

ist in Abb. 4.5 graphisch dargestellt.

Eine Verlangsamung der Erholung des Calciumsignals durch mitochondriale Veränderungen wurde bereits bei normalen Alterungsprozessen nachgewiesen und mit kumuliertem zellulärem Stress in Verbindung gebracht [Xiong et al., 2002]. Die G93A hMN müssen früh in der Entwicklung auftretende Stressoren wie eine erhöhte Erregbarkeit [Pieri et al., 2003; Kuo et al., 2004; Bories et al., 2007; Pambo-Pambo et al., 2009] zum Erhalt der Zellen und der Funktion kompensieren. Eine Verringerung der Erregbarkeit durch Expression anderer Kanäle oder Kanalmodifikationen, welche die Veränderungen in Ruhepotential und Aktionspotentialschwelle erklären, ist denkbar. Auch könnte die Übererregbarkeit zu einem höheren Energieverbrauch der Zellen und so zu einer höheren Aktivität der Atmungskette führen [Heath and Shaw, 2002]. Ein höherer Energieverbrauch wurde bei ALS-Patienten nachgewiesen [Dupuis et al., 2010]. Dies belastet die Mitochondrien bereits früh in einer Phase der Entwicklung, in der sie auch als Calciumspeicher wichtiger werden (gezeigt als mCU-abhängige Steigerung mitochondrialer Calciumaufnahmekapazität in hippocampalen Körnerzellen zwischen der vierten und sechsten postnatalen Woche [Lee et al., 2009]). Das unveränderte mitochondriale Membranpotential bei den G93A hMN weist auf funktionstüchtige Mitochondrien hin. Trotzdem sind diese im Endstadium kaum mehr an der Calciumaufnahme beteiligt. Auch Mitochondrien von Alzheimerpatienten haben eine reduzierte Calciumaufnahmefähigkeit [Kumar et al., 1994].

Mit den gezeigten Daten vereinbar wäre die Theorie einer kompensatorischen Expressionsverringerung des mCU, um zusätzlichen Stress durch Calciumaufnahme in die Mitochondrien und nötige ausgleichende Regeneration des durch die Calciumaufnahme depolarisierten mitochondrialen Membranpotentials [Duchen, 1992; Loew et al., 1994] zu verringern und einem Zelltod vorzubeugen. Auch eine oxidative Schädigung der Calciumaufnahmewege entweder durch ROS aus der Atmungskette oder durch die mutierte SOD1 wäre denkbar. Zum Ausgleich der Verringerung der Calciumspeicherkapazität wäre dann eine Expressions- oder Funktionssteigerung der Calciumtransporter der Plasmamembran vorhanden. Die Zellen könnten so die frühen Stressoren gut kompensieren, sie überleben einige Monate. Eine Steigerung der Expression oder Funktion des NCX ist dabei wahrscheinlicher, da die PMCA durch eine geringere Calciumaffinität der Hauptextrusionsweg bei niedrigen Calciumkonzentrationen ist und der NCX erst bei hohen Konzentrationen dazu kommt [Wanaverbecq et al., 2003]. Außerdem wurde bereits in Gehirnen von Alzheimer-Patienten eine verstärkte Aktivität des NCX nachgewiesen [Colvin et al., 1994] und im Gegensatz zur reinen Hemmung von SERCA [Kaplan et al., 2003] und PMCA [Zaidi and Michaelis, 1999] konnte auch eine Aktivierung des NCX durch ROS gezeigt werden [Goldhaber, 1996]. Allerdings wurde auch eine neuroprotektive Rolle der PMCA postuliert [Kurnellas et al., 2005] und eine Expressionssteigerung bei Calciumhomöostasestörungen gezeigt [Kuo et al., 1997]. Sowohl die PMCA direkt also auch der NCX indirekt über die Natrium-Kalium-ATPase benöti-

gen weitere Energie und sind sättigbare Transporter. Der Energiemangel könnte zu einem für die Mitochondrien toxischen Teufelskreis führen, die unzureichende Transportkapazität der Plasmamembrantransporter bei sehr hoher Calciumbelastung (z.B. durch verstärkte glutamaterge Erregung) zu einer Calciumüberladung der Zellen. Wenn die Kompensationsmechanismen nicht mehr ausreichen, führt dies dann zum Zelltod durch eine Aktivierung von calciumabhängigen Enzymen oder mitochondrialer Apoptoseinduktion.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wird im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Molekulare Neurophysiologie unter Leitung von Frau Prof. Dr. Birgit Liss in Ulm eine Genexpressionsstudie durchgeführt. Dabei sollen die Expressionslevel der mitochondrialen und Plasmamembrantransporter von hMN und oMN in wt und G93A Mäusen mittels quantitativer Einzelzell-PCR verglichen werden. Auch eine humane Studie zur Expression der Transporter beim Gesunden und ALS-Patienten ist geplant.

Gelingt der Nachweis einer Expressionsverringerung des mCU bei gleichzeitiger Expressionssteigerung der Plasmamembrantransporter wäre dies ein weiterer Grund, die Calciumhomöostase als Ansatzpunkt für ein therapeutisches Eingreifen intensiv zu untersuchen. Ein Fortschritt in der Therapieentwicklung ist dringend nötig, um den ALS-Patienten eine länger anhaltende, bessere Lebensqualität zu ermöglichen. Ein Eingreifen in das durch zelleigene Prozesse aufgebaute sensible Calciumgleichgewicht ist schwierig. Eine Erhöhung der Calciumpufferkapazität der Neurone wurde aber bereits im Mausmodell als positiv gewertet [Beers et al., 2001]. Eine Unterstützung der Kompensationsbemühungen der Zellen durch Aktivierung des Calciumtransports über die Plasmamembran hätte großes Potential für ein degenerationsverzögerndes Medikament. Auch die Mitochondrientransporter wären ein möglicher Angriffspunkt. Kaempferol, eine Flavonoid aus Ginkgo oder roten Weintrauben, wurde als Aktivator des mCU identifiziert [Montero et al., 2004]. Eine Studie zur Wirkung im ALS-Mausmodell wäre auf dem Hintergrund der hier vorgestellten Befunde wegen des direkten mechanistischen Nachweises zu einem Zeitpunkt des Zellsterbens vielversprechend.

Literaturverzeichnis

- Adrian, E. D. and Bronk, D. W. (1929). The discharge of impulses in motor nerve fibres: Part II. The frequency of discharge in reflex and voluntary contractions. *The Journal of Physiology*, 67(2):119–151.
- AHF-Analysetechnik (2011). <http://www.ahf.de> (abgerufen am 31.7.11).
- Albo, F., Pieri, M., and Zona, C. (2004). Modulation of AMPA receptors in spinal motor neurons by the neuroprotective agent riluzole. *Journal of Neuroscience Research*, 78(2):200–207.
- Alessandri-Haber, N., Alcaraz, G., Deleuze, C., Jullien, F., Manrique, C., Couraud, F., Crest, M., and Giraud, P. (2002). Molecular determinants of emerging excitability in rat embryonic motoneurons. *The Journal of Physiology*, 541(1):25–39.
- Alexander, G. M., Erwin, K. L., Byers, N., Deitch, J. S., Augelli, B. J., Blankenhorn, E. P., and Heiman-Patterson, T. D. (2004). Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 130(1-2):7–15.
- Alexianu, M. E., Ho, B. K., Mohamed, A. H., La Bella, V., Smith, R. G., and Appel, S. H. (1994). The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 36(6):846–858.
- ALS-Datenbank (2011). <http://alsod.iop.kcl.ac.uk> (abgerufen am 21.8.2011).
- Alves, C. J., de Santana, L. P., Santos, A. J. D. d., de Oliveira, G. P., Duobles, T., Scorisa, J. M., Martins, R. S., Maximino, J. R., and Chadi, G. (2011). Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Research*, 1394:90–104.
- Amendola, J., Gueritaud, J. P., d’Incamps, B. L., Bories, C., Liabeuf, S., Allene, C., Pambo-Pambo, A., and Durand, J. (2007). Postnatal electrical and morphological abnormalities in lumbar motoneurons from transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Archives Italiennes de Biologie*, 145(3-4):311–323.
- Andreeva, N., Khodorov, B., Stelmashook, E., Cragoe, E., and Victorov, I. (1991). Inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange enhances delayed neuronal death elicited by glutamate in cerebellar granule cell cultures. *Brain Research*, 548(1-2):322–325.

- Andrus, P. K., Fleck, T. J., Gurney, M. E., and Hall, E. D. (1998). Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 71(5):2041–2048.
- Armstrong, C. M. and Gilly, W. F. (1992). Access resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping. *Methods in Enzymology*, 207:100–122.
- Arnaudeau, S. (2001). Mitochondria Recycle Ca^{2+} to the Endoplasmic Reticulum and Prevent the Depletion of Neighboring Endoplasmic Reticulum Regions. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31):29430–29439.
- Azarashvili, T., Stricker, R., and Reiser, G. (2010). The mitochondria permeability transition pore complex in the brain with interacting proteins - promising targets for protection in neurodegenerative diseases. *Biological Chemistry*, 391(6):619–629.
- Baba-Aissa, F., Raeymaekers, L., Wuytack, F., De Greef, C., Missiaen, L., and Casteels, R. (1996). Distribution of the organellar Ca^{2+} transport ATPase SERCA2 isoforms in the cat brain. *Brain Research*, 743(1-2):141–153.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., Brunskill, E. W., Sayen, M. R., Gottlieb, R. A., Dorn, G. W., Robbins, J., and Molkentin, J. D. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 434(7033):658–662.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J., and Molkentin, J. D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature Cell Biology*, 9(5):550–555.
- Balakrishnan, S. (2006). *The Mitochondrial Role in Calcium Metabolism and Differential Calcium Buffering Capacity of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Vulnerable and Resistant Motoneurons from Mice*. PhD thesis, Georg-August-Universität Göttingen.
- Barbeito, A. G., Mesci, P., and Boillée, S. (2010). Motor neuron-immune interactions: the vicious circle of ALS. *Journal of Neural Transmission*, 117(8):981–1000.
- Barber, S. C. and Shaw, P. J. (2009). Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radical Biology & Medicine*, 48(5):629–641.
- Barrett, J. N., Magleby, K. L., and Pallotta, B. S. (1982). Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *The Journal of Physiology*, 331:211–230.

- Barski, J. J., Hartmann, J., Rose, C. R., Hoebeek, F., Mörl, K., Noll-Hussong, M., De Zeeuw, C. I., Konnerth, A., and Meyer, M. (2003). Calbindin in cerebellar Purkinje cells is a critical determinant of the precision of motor coordination. *The Journal of Neuroscience*, 23(8):3469–3477.
- Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., Bao, X. R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R. L., Koteliansky, V., and Mootha, V. K. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360):341–345.
- Bayliss, D. A., Viana, F., Bellingham, M. C., and Berger, A. J. (1994). Characteristics and postnatal development of a hyperpolarization-activated inward current in rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 71(1):119–128.
- Bayliss, D. A., Viana, F., Talley, E. M., and Berger, A. J. (1997). Neuromodulation of hypoglossal motoneurons: cellular and developmental mechanisms. *Respiration Physiology*, 110(2-3):139–150.
- Beers, D. R., Ho, B. K., Siklós, L., Alexianu, M. E., Mosier, D. R., Mohamed, A. H., Otsuka, Y., Kozovska, M. E., McAlhany, R. E., Smith, R. G., and Appel, S. H. (2001). Parvalbumin overexpression alters immune-mediated increases in intracellular calcium, and delays disease onset in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 79(3):499–509.
- Bekkers, J. M. and Häusser, M. (2007). Targeted dendrotomy reveals active and passive contributions of the dendritic tree to synaptic integration and neuronal output. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27):11447–11452.
- Bennett, D. J., Li, Y., Harvey, P. J., and Gorassini, M. A. (2001a). Evidence for plateau potentials in tail motoneurons of awake chronic spinal rats with spasticity. *Journal of Neurophysiology*, 86(4):1972–1982.
- Bennett, D. J., Li, Y., and Siu, M. (2001b). Plateau potentials in sacrocaudal motoneurons of chronic spinal rats, recorded in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 86(4):1955–1971.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 330(9):585–591.
- Benz, R. and McLaughlin, S. (1983). The molecular mechanism of action of the proton ionophore FCCP (carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone). *Biophysical Journal*, 41(3):381–398.

- Berger, A. J., Bayliss, D. A., and Viana, F. (1996). Development of hypoglossal motoneurons. *Journal of Applied Physiology*, 81(3):1039–1048.
- Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., Blachly-Dyson, E., Blalchy-Dyson, E., Di Lisa, F., and Forte, M. A. (2006). The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *The FEBS Journal*, 273(10):2077–2099.
- Bernardi, P. and Petronilli, V. (1996). The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 28(2):131–138.
- Beutner, G., Sharma, V. K., Giovannucci, D. R., Yule, D. I., and Sheu, S. S. (2001). Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(24):21482–21488.
- Blaustein, M. P. and Lederer, W. J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological Reviews*, 79(3):763–854.
- Bodhinathan, K., Kumar, A., and Foster, T. C. (2010). Redox sensitive calcium stores underlie enhanced afterhyperpolarization of aged neurons: role for ryanodine receptor mediated calcium signaling. *Journal of Neurophysiology*, 104(5):2586–2593.
- Boërio, D., Kalmar, B., Greensmith, L., and Bostock, H. (2010). Excitability properties of mouse motor axons in the mutant SOD1(G93A) model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, 41(6):774–784.
- Boillée, S., Vande Velde, C., and Cleveland, D. W. (2006). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*, 52(1):39–59.
- Bories, C., Amendola, J., Lamotte d’Incamps, B., and Durand, J. (2007). Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The European Journal of Neuroscience*, 25(2):451–459.
- Bosco, D. A., Morfini, G., Karabacak, N. M., Song, Y., Gros-Louis, F., Pasinelli, P., Goolsby, H., Fontaine, B. A., Lemay, N., McKenna-Yasek, D., Frosch, M. P., Agar, J. N., Julien, J.-P., Brady, S. T., and Brown, R. H. (2010). Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nature Neuroscience*, 13(11):1396–1403.
- Bostock, H., Sharief, M. K., Reid, G., and Murray, N. M. (1995). Axonal ion channel dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 118(1):217–225.
- Brenner, R., Jegla, T. J., Wickenden, A., Liu, Y., and Aldrich, R. W. (2000). Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium

- channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(9):6453–6461.
- Brownstone, R. M. and Stuart, D. G. (2011). Whither motoneurons? *Brain Research*, 1409:93–103.
- Buntinas, L., Gunter, K. K., Sparagna, G. C., and Gunter, T. E. (2001). The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1504(2-3):248–261.
- Büttner-Ennever, J. A. and Horn, A. K. (1997). Anatomical substrates of oculomotor control. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(6):872–879.
- Byrne, S., Walsh, C., Lynch, C., Bede, P., Elamin, M., Kenna, K., McLaughlin, R., and Hardiman, O. (2010). Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 82(6):623–627.
- Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G., Crovetto, F., and Kratzig, C. (1974). The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 6(4):361–371.
- Carlesi, C., Pasquali, L., Piazza, S., Lo Gerfo, A., Caldarazzo Ienco, E., Alessi, R., Fornai, F., and Siciliano, G. (2011). Strategies for clinical approach to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Archives Italiennes de Biologie*, 149(1):151–167.
- Carlin, K. P., Jiang, Z., and Brownstone, R. M. (2000a). Characterization of calcium currents in functionally mature mouse spinal motoneurons. *The European Journal of Neuroscience*, 12(5):1624–1634.
- Carlin, K. P., Jones, K. E., Jiang, Z., Jordan, L. M., and Brownstone, R. M. (2000b). Dendritic L-type calcium currents in mouse spinal motoneurons: implications for bistability. *The European Journal of Neuroscience*, 12(5):1635–1646.
- Carlin, K. P., Liu, J., and Jordan, L. M. (2008). Postnatal changes in the inactivation properties of voltage-gated sodium channels contribute to the mature firing pattern of spinal motoneurons. *Journal of neurophysiology*, 99(6):2864–2876.
- Carrascal, L., Nieto-Gonzalez, J. L., Cameron, W. E., Torres, B., and Nunez-Abades, P. A. (2005). Changes during the postnatal development in physiological and anatomical characteristics of rat motoneurons studied in vitro. *Brain Research Brain Research Reviews*, 49(2):377–387.
- Carri, M. T., Ferri, A., Battistoni, A., Famhy, L., Gabbianelli, R., Poccia, F., and Rotilio, G. (1997). Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic

- lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca^{2+} concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Letters*, 414(2):365–368.
- Castaldo, P., Cataldi, M., Magi, S., Lariccia, V., Arcangeli, S., and Amoroso, S. (2009). Role of the mitochondrial sodium/calcium exchanger in neuronal physiology and in the pathogenesis of neurological diseases. *Progress in Neurobiology*, 87(1):58–79.
- Chalmers, S. and Nicholls, D. G. (2003). The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(21):19062–19070.
- Chang, Q. and Martin, L. J. (2011). Glycine receptor channels in spinal motoneurons are abnormal in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Neuroscience*, 31(8):2815–2827.
- Charcot, J. and Joffroy, A. (1869). Deux cas d’atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antéro-latéraux de la moelle épinière. *Arch Physiol Neurol Path*, 2:744–750.
- Chinopoulos, C. and Adam-Vizi, V. (2010). Mitochondrial Ca^{2+} sequestration and precipitation revisited. *The FEBS Journal*, 277(18):3637–3651.
- Cohen, T. J., Lee, V. M. Y., and Trojanowski, J. Q. (2011). TDP-43 functions and pathogenic mechanisms implicated in TDP-43 proteinopathies. *Trends in Molecular Medicine*, 17(11):659–667.
- Colegrove, S. L., Albrecht, M. A., and Friel, D. D. (2000). Dissection of mitochondrial Ca^{2+} uptake and release fluxes in situ after depolarization-evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevations in sympathetic neurons. *The Journal of General Physiology*, 115(3):351–370.
- Colvin, R. A., Davis, N., Wu, A., Murphy, C. A., and Levensgood, J. (1994). Studies of the mechanism underlying increased $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity in Alzheimer’s disease brain. *Brain Research*, 665(2):192–200.
- Coussee, E., De Smet, P., Bogaert, E., Elens, I., Van Damme, P., Willems, P., Koopman, W., Van Den Bosch, L., and Callewaert, G. (2011). G37R SOD1 mutant alters mitochondrial complex I activity, Ca^{2+} uptake and ATP production. *Cell Calcium*, 49(4):217–225.
- Cox, D. A., Conforti, L., Sperelakis, N., and Matlib, M. A. (1993). Selectivity of inhibition of Na^{+} - Ca^{2+} exchange of heart mitochondria by benzothiazepine CGP-37157. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 21(4):595–599.

- Cozzolino, M. and Carri, M. T. (2011). Mitochondrial dysfunction in ALS. *Progress in Neurobiology*, [Epub ahead of print].
- Cronin, S., Hardiman, O., and Traynor, B. J. (2007). Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology*, 68(13):1002–1007.
- Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T. G., Balla, T., and Hajnóczky, G. (2010). Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Molecular Cell*, 39(1):121–132.
- Da Cruz, S. and Cleveland, D. W. (2011). Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond. *Current Opinion in Neurobiology*, [Epub ahead of print].
- Damiano, M., Starkov, A. A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Beal, M. F., and Manfredi, G. (2006). Neural mitochondrial Ca^{2+} capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *Journal of Neurochemistry*, 96(5):1349–1361.
- Das, A. M. and Harris, D. A. (1990). Control of mitochondrial ATP synthase in heart cells: inactive to active transitions caused by beating or positive inotropic agents. *Cardiovascular Research*, 24(5):411–417.
- David, G. and Barrett, E. F. (2000). Stimulation-evoked increases in cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ in mouse motor nerve terminals are limited by mitochondrial uptake and are temperature-dependent. *The Journal of Neuroscience*, 20(19):7290–7296.
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., and Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(336–340):1–7.
- De Vos, K. J., Chapman, A. L., Tennant, M. E., Manser, C., Tudor, E. L., Lau, K.-F., Brownlees, J., Ackerley, S., Shaw, P. J., McLoughlin, D. M., Shaw, C. E., Leigh, P. N., Miller, C. C. J., and Grierson, A. J. (2007). Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Human Molecular Genetics*, 16(22):2720–2728.
- Deister, C. A., Chan, C. S., Surmeier, D. J., and Wilson, C. J. (2009). Calcium-Activated SK Channels Influence Voltage-Gated Ion Channels to Determine the Precision of Firing in Globus Pallidus Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 29(26):8452–8461.
- Deng, H.-X., Chen, W., Hong, S.-T., Boycott, K. M., Gorrie, G. H., Siddique, N., Yang, Y., Fecto, F., Shi, Y., Zhai, H., Jiang, H., Hirano, M., Rampersaud, E., Jansen, G. H., Donkervoort, S., Bigio, E. H., Brooks, B. R., Ajroud, K., Sufit, R. L., Haines, J. L.,

- Mugnaini, E., Pericak-Vance, M. A., and Siddique, T. (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*, 477(7463):211–215.
- DGN (2011). <http://www.dgn.org> (abgerufen am 23.8.11).
- DiChiara, T. J. and Reinhart, P. H. (1997). Redox modulation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *The Journal of Neuroscience*, 17(13):4942–4955.
- Dormann, D. and Haass, C. (2011). TDP-43 and FUS: a nuclear affair. *Trends in Neurosciences*, 34(7):339–348.
- Duchen, M. R. (1992). Ca^{2+} -dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *The Biochemical Journal*, 283(1):41–50.
- Duchen, M. R. and Biscoe, T. J. (1992). Relative mitochondrial membrane potential and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in type I cells isolated from the rabbit carotid body. *The Journal of Physiology*, 450:33–61.
- Dupuis, L., di Scala, F., Rene, F., de Tapia, M., Oudart, H., Pradat, P.-F., Meininger, V., and Loeffler, J.-P. (2003). Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis. *The FASEB Journal*, 17(14):2091–2093.
- Dupuis, L., Pradat, P.-F., Ludolph, A. C., and Loeffler, J.-P. (2010). Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurology*, 10(1):75–82.
- Dykens, J. A. and Stout, A. K. (2001). Assessment of mitochondrial membrane potential in situ using single potentiometric dyes and a novel fluorescence resonance energy transfer technique. *Methods in Cell Biology*, 65:285–309.
- Elbasiouny, S. M., Amendola, J., Durand, J., and Heckman, C. J. (2010). Evidence from computer simulations for alterations in the membrane biophysical properties and dendritic processing of synaptic inputs in mutant superoxide dismutase-1 motoneurons. *The Journal of Neuroscience*, 30(16):5544–5558.
- Ellis, D. Z., Rabe, J., and Sweadner, K. J. (2003). Global loss of Na,K-ATPase and its nitric oxide-mediated regulation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Neuroscience*, 23(1):43–51.
- Enyedi, A., Flura, M., Sarkadi, B., Gardos, G., and Carafoli, E. (1987). The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(13):6425–6430.

- Fakler, B. and Adelman, J. P. (2008). Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron*, 59(6):873–881.
- Ferrante, R. J., Browne, S. E., Shinobu, L. A., Bowling, A. C., Baik, M. J., MacGarvey, U., Kowall, N. W., Brown, R. H., and Beal, M. F. (1997). Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 69(5):2064–2074.
- Ferrucci, M., Spalloni, A., Bartalucci, A., Cantafora, E., Fulceri, F., Nutini, M., Longone, P., Paparelli, A., and Fornai, F. (2010). A systematic study of brainstem motor nuclei in a mouse model of ALS, the effects of lithium. *Neurobiology of Disease*, 37(2):370–383.
- Fill, M., Coronado, R., Mickelson, J. R., Vilven, J., Ma, J. J., Jacobson, B. A., and Louis, C. F. (1990). Abnormal ryanodine receptor channels in malignant hyperthermia. *Biophysical Journal*, 57(3):471–475.
- Fischer, L. R. and Glass, J. D. (2007). Axonal degeneration in motor neuron disease. *Neuro-Degenerative Diseases*, 4(6):431–442.
- Friel, D. D. and Tsien, R. W. (1994). An FCCP-sensitive Ca^{2+} store in bullfrog sympathetic neurons and its participation in stimulus-evoked changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *The Journal of Neuroscience*, 14(7):4007–4024.
- Fuchs, A., Kutterer, S., Schütz, B., Keller, B. U., and Roeper, J. (2011a). Motoneurons develop an activity-dependent failure of remodeled calcium clearance during disease progression in an ALS mouse model. In *SfN Annual Meeting, Program No. 53.15. Washington, DC*.
- Fuchs, A., Kutterer, S., Schütz, B., Keller, B. U., and Roeper, J. (2011b). Vulnerable motoneurons develop a deficit in mitochondrial calcium clearance during disease endstage in an ALS mouse model. In *Neuroscience Winter Conference Sölden, Abstract Number P10*.
- Fuchs, A., Ringer, C., Bilkei-Gorzo, A., Weihe, E., Roeper, J., and Schütz, B. (2010a). Downregulation of the potassium chloride cotransporter KCC2 in vulnerable motoneurons in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 69(10):1057–1070.
- Fuchs, A., Schütz, B., Liss, B., and Roeper, J. (2008). Selective and disease-onset related action potential broadening in vulnerable brainstem motoneurons in the SOD1-G93A ALS mouse model. In *SfN Annual Meeting, Program No. 445.10. Washington, DC*.

- Fuchs, A., Schütz, B., Liss, B., and Roeper, J. (2009a). Persistent sodium currents are not altered at disease endstage in vulnerable brainstem motoneurons of the SOD1-G93A ALS mouse model. In *International Symposium on ALS/MND, Abstract Number P50*.
- Fuchs, A., Schütz, B., Liss, B., and Roeper, J. (2009b). Persistent sodium currents are not altered at disease endstage in vulnerable brainstem motoneurons of the SOD1-G93A ALS mouse model. In *SfN Annual Meeting, Program No. 631.2. Chicago, IL*.
- Fuchs, A., Schütz, B., and Roeper, J. (2010b). A role of persistent currents in motoneuron degeneration? In *Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies, Abstract Number S-TUE-1-4*.
- Funk, G. D., Kanjhan, R., Walsh, C., Lipski, J., Comer, A. M., Parkis, M. A., and Housley, G. D. (1997). P2 receptor excitation of rodent hypoglossal motoneuron activity in vitro and in vivo: a molecular physiological analysis. *The Journal of Neuroscience*, 17(16):6325–6337.
- Garaschuk, O. and Konnerth, A. (2010). In vivo two-photon calcium imaging using multicell bolus loading. *Cold Spring Harbor protocols*, 2010(10):pdb.prot5482.
- Gardiner, P. F. (1993). Physiological properties of motoneurons innervating different muscle unit types in rat gastrocnemius. *Journal of Neurophysiology*, 69(4):1160–1170.
- Giannini, G., Conti, A., Mammarella, S., Scrobogna, M., and Sorrentino, V. (1995). The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *The Journal of Cell Biology*, 128(5):893–904.
- Gincel, D., Zaid, H., and Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *The Biochemical Journal*, 358(1):147–155.
- Gizzi, M., DiRocco, A., Sivak, M., and Cohen, B. (1992). Ocular motor function in motor neuron disease. *Neurology*, 42(5):1037–1046.
- Goldhaber, J. I. (1996). Free radicals enhance $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in ventricular myocytes. *The American Journal of Physiology*, 271(3 Pt 2):H823–833.
- Gong, Y. H., Parsadanian, A. S., Andreeva, A., Snider, W. D., and Elliott, J. L. (2000). Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *The Journal of Neuroscience*, 20(2):660–665.
- Grosskreutz, J., Haastert, K., Dewil, M., Van Damme, P., Callewaert, G., Robberecht, W., Dengler, R., and Van Den Bosch, L. (2007). Role of mitochondria in kainate-induced fast Ca^{2+} transients in cultured spinal motor neurons. *Cell Calcium*, 42(1):59–69.

- Grosskreutz, J., Van Den Bosch, L., and Keller, B. U. (2010). Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium*, 47(2):165–174.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(6):3440–3450.
- Guatteo, E., Carunchio, I., Pieri, M., Albo, F., Canu, N., Mercuri, N. B., and Zona, C. (2007). Altered calcium homeostasis in motor neurons following AMPA receptor but not voltage-dependent calcium channels’ activation in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 28(1):90–100.
- Gunasekaran, R., Narayani, R. S., Vijayalakshmi, K., Alladi, P. A., Shobha, K., Nalini, A., Sathyaprabha, T. N., and Raju, T. R. (2009). Exposure to cerebrospinal fluid of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients alters Nav1.6 and Kv1.6 channel expression in rat spinal motor neurons. *Brain Research*, 1255:170–179.
- Gunter, T. E. and Sheu, S.-S. (2009). Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca^{2+} transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787(11):1291–1308.
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., and Deng, H. X. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264(5166):1772–1775.
- Haenggeli, C. and Kato, A. C. (2002). Differential vulnerability of cranial motoneurons in mouse models with motor neuron degeneration. *Neuroscience Letters*, 335(1):39–43.
- Hart, M. N., Cancilla, P. A., Frommes, S., and Hirano, A. (1977). Anterior horn cell degeneration and Bunina-type inclusions associated with dementia. *Acta Neuropathologica*, 38(3):225–228.
- Harvey, P. J., Li, X., Li, Y., and Bennett, D. J. (2006). 5-HT₂ receptor activation facilitates a persistent sodium current and repetitive firing in spinal motoneurons of rats with and without chronic spinal cord injury. *Journal of Neurophysiology*, 96(3):1158–1170.
- Harwood, C. A., McDermott, C. J., and Shaw, P. J. (2009). Physical activity as an exogenous risk factor in motor neuron disease (MND): a review of the evidence. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 10(4):191–204.
- He, L. and Lemasters, J. J. (2002). Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Letters*, 512(1-3):1–7.

- Heath, P. R. and Shaw, P. J. (2002). Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, 26(4):438–458.
- Heckman, C. J., Mottram, C., Quinlan, K., Theiss, R., and Schuster, J. (2009). Motoneuron excitability: the importance of neuromodulatory inputs. *Clinical Neurophysiology*, 120(12):2040–2054.
- Hegedus, J., Putman, C. T., Tyreman, N., and Gordon, T. (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Physiology*, 586(14):3337–3351.
- Heiman-Patterson, T. D., Deitch, J. S., Blankenhorn, E. P., Erwin, K. L., Perreault, M. J., Alexander, B. K., Byers, N., Toman, I., and Alexander, G. M. (2005). Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)1Gur mouse model of ALS. *Journal of the Neurological Sciences*, 236(1-2):1–7.
- HEKA (2004). *EPC 10 Manual*. HEKA Elektronik GmbH.
- Henkart, M. (1980). Identification and function of intracellular calcium stores in axons and cell bodies of neurons. *Federation Proceedings*, 39(10):2783–2789.
- Henriques, A., Pitzer, C., and Schneider, A. (2010). Characterization of a Novel SOD-1(G93A) Transgenic Mouse Line with Very Decelerated Disease Development. *PLoS One*, 5(11):e15445.
- Henzi, V. and MacDermott, A. B. (1992). Characteristics and function of Ca^{2+} - and inositol 1,4,5-trisphosphate-releasable stores of Ca^{2+} in neurons. *Neuroscience*, 46(2):251–273.
- Ho, B. K., Alexianu, M. E., Colom, L. V., Mohamed, A. H., Serrano, F., and Appel, S. H. (1996). Expression of calbindin-D28K in motoneuron hybrid cells after retroviral infection with calbindin-D28K cDNA prevents amyotrophic lateral sclerosis IgG-mediated cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13):6796–6801.
- Hoppe, U. C. (2010). Mitochondrial calcium channels. *FEBS Letters*, 584(10):1975–1981.
- Hounsgaard, J., Hultborn, H., Jespersen, B., and Kiehn, O. (1988). Bistability of alpha-motoneurons in the decerebrate cat and in the acute spinal cat after intravenous 5-hydroxytryptophan. *The Journal of Physiology*, 405:345–367.
- Hounsgaard, J. and Kiehn, O. (1989). Serotonin-induced bistability of turtle motoneurons caused by a nifedipine-sensitive calcium plateau potential. *The Journal of Physiology*, 414:265–282.

- Hounsgaard, J. and Mintz, I. (1988). Calcium conductance and firing properties of spinal motoneurons in the turtle. *The Journal of Physiology*, 398:591–603.
- Huang, C. S., Song, J. H., Nagata, K., Yeh, J. Z., and Narahashi, T. (1997). Effects of the neuroprotective agent riluzole on the high voltage-activated calcium channels of rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 282(3):1280–1290.
- Ichas, F. and Mazat, J. P. (1998). From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1366(1-2):33–50.
- Inghilleri, M. and Iacovelli, E. (2011). Clinical neurophysiology in ALS. *Archives Italiennes de Biologie*, 149(1):57–63.
- Invitrogen (2011). <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp03008.pdf> (abgerufen am 17.8.2011).
- Israelson, A., Arbel, N., Da Cruz, S., Ilieva, H., Yamanaka, K., Shoshan-Barmatz, V., and Cleveland, D. W. (2010). Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS. *Neuron*, 67(4):575–587.
- Jaarsma, D., Holstege, J. C., Troost, D., Davis, M., Kennis, J., Haasdijk, E. D., and de Jong, V. J. (1996). Induction of c-Jun immunoreactivity in spinal cord and brainstem neurons in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 219(3):179–182.
- Jackson, M. B. (2001). Whole-Cell Voltage Clamp Recording. *Current Protocols in Neuroscience*, Chapter 6(Unit 6):1–30.
- JacksonLaboratories (2011). <http://www.jaxmice.jax.org/strain/002726.html> (abgerufen am 25.8.2011).
- Jahn, K., Grosskreutz, J., Haastert, K., Ziegler, E., Schlesinger, F., Grothe, C., Dengler, R., and Bufler, J. (2006). Temporospatial coupling of networked synaptic activation of AMPA-type glutamate receptor channels and calcium transients in cultured motoneurons. *Neuroscience*, 142(4):1019–1029.
- Jaiswal, M. K. and Keller, B. U. (2009). Cu/Zn superoxide dismutase typical for familial amyotrophic lateral sclerosis increases the vulnerability of mitochondria and perturbs Ca^{2+} homeostasis in SOD1G93A mice. *Molecular Pharmacology*, 75(3):478–489.
- Jaiswal, M. K., Zech, W.-D., Goos, M., Leutbecher, C., Ferri, A., Zippelius, A., Carri, M. T., Nau, R., and Keller, B. U. (2009). Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease. *BMC Neuroscience*, 10:64.

- James, P. H., Pruschy, M., Vorherr, T. E., Penniston, J. T., and Carafoli, E. (1989). Primary structure of the cAMP-dependent phosphorylation site of the plasma membrane calcium pump. *Biochemistry*, 28(10):4253–4258.
- Jeffs, G. J., Meloni, B. P., Sokolow, S., Herchuelz, A., Schurmans, S., and Knuckey, N. W. (2008). NCX3 knockout mice exhibit increased hippocampal CA1 and CA2 neuronal damage compared to wild-type mice following global cerebral ischemia. *Experimental Neurology*, 210(1):268–273.
- Jeon, D., Chu, K., Jung, K.-H., Kim, M., Yoon, B.-W., Lee, C. J., Oh, U., and Shin, H.-S. (2008). Na⁺/Ca²⁺ exchanger 2 is neuroprotective by exporting Ca²⁺ during a transient focal cerebral ischemia in the mouse. *Cell Calcium*, 43(5):482–491.
- Jiang, D., Zhao, L., and Clapham, D. E. (2009). Genome-Wide RNAi Screen Identifies Letm1 as a Mitochondrial Ca²⁺/H⁺ Antiporter. *Science*, 326(5949):144–147.
- John, L. M., Lechleiter, J. D., and Camacho, P. (1998). Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *The Journal of Cell Biology*, 142(4):963–973.
- Johnson, I. and Spence, M. T. Z., editors (2011). *Molecular Probes Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. Molecular Probes Invitrogen, 11th edition.
- Jung, C., Higgins, C. M. J., and Xu, Z. (2002). Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 83(3):535–545.
- Jung, D. W., Baysal, K., and Brierley, G. P. (1995). The sodium-calcium antiport of heart mitochondria is not electroneutral. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(2):672–678.
- Kanai, K., Kuwabara, S., Misawa, S., Tamura, N., Ogawara, K., Nakata, M., Sawai, S., Hattori, T., and Bostock, H. (2006). Altered axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis: impaired potassium channel function related to disease stage. *Brain*, 129(4):953–962.
- Kann, O. and Kovacs, R. (2007). Mitochondria and neuronal activity. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 292(2):641–657.
- Kanning, K. C., Kaplan, A., and Henderson, C. E. (2010). Motor Neuron Diversity in Development and Disease. *Annual Review of Neuroscience*, 33:409–440.
- Kano, M., Garaschuk, O., Verkhratsky, A., and Konnerth, A. (1995). Ryanodine receptor-mediated intracellular calcium release in rat cerebellar Purkinje neurones. *The Journal of Physiology*, 487(1):1–16.

- Kaplan, P., Babusikova, E., Lehotsky, J., and Dobrota, D. (2003). Free radical-induced protein modification and inhibition of Ca^{2+} -ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 248(1-2):41–47.
- Kawahara, Y., Ito, K., Sun, H., Aizawa, H., Kanazawa, I., and Kwak, S. (2004). Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature*, 427(6977):801.
- Kawamata, H. and Manfredi, G. (2010). Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131(7-8):517–526.
- Kernell, D. (1965). The Limits of Firing Frequency in Cat Lumbosacral Motoneurons Possessing Different Time Course of Afterhyperpolarization. *Acta Physiologica Scandinavica*, 65:87–100.
- Kieran, D., Kalmar, B., Dick, J. R. T., Riddoch-Contreras, J., Burnstock, G., and Greensmith, L. (2004). Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nature Medicine*, 10(4):402–405.
- Kiernan, M. C. (2009). Hyperexcitability, persistent Na^{+} conductances and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, 218(1):1–4.
- Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J. R., and Zoing, M. C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 377(9769):942–955.
- Kim, B. and Matsuoka, S. (2008). Cytoplasmic Na^{+} -dependent modulation of mitochondrial Ca^{2+} via electrogenic mitochondrial Na^{+} - Ca^{2+} exchange. *The Journal of Physiology*, 586(6):1683–1697.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., and Clapham, D. E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427(6972):360–364.
- Klingauf, J. and Neher, E. (1997). Modeling buffered Ca^{2+} diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophysical Journal*, 72(2 Pt 1):674–690.
- Kole, M. H. P. (2011). First Node of Ranvier Facilitates High-Frequency Burst Encoding. *Neuron*, 71(4):671–682.
- Kovacs, R. (2005). Mitochondrial Calcium Ion and Membrane Potential Transients Follow the Pattern of Epileptiform Discharges in Hippocampal Slice Cultures. *The Journal of Neuroscience*, 25(17):4260–4269.
- Krammer, E. B., Rath, T., and Lischka, M. F. (1979a). Somatotopic organization of the hypoglossal nucleus: a HRP study in the rat. *Brain Research*, 170(3):533–537.

- Krammer, E. B., Rath, T., and Lischka, M. F. (1979b). Somatotopic organization of the hypoglossal nucleus: a HRP study in the rat. *Brain Research*, 170(3):533–537.
- Kruman, I. I., Pedersen, W. A., Springer, J. E., and Mattson, M. P. (1999). ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Experimental Neurology*, 160(1):28–39.
- Kumar, U., Dunlop, D. M., and Richardson, J. S. (1994). Mitochondria from Alzheimer’s fibroblasts show decreased uptake of calcium and increased sensitivity to free radicals. *Life Sciences*, 54(24):1855–1860.
- Kuner, T. and Augustine, G. J. (2000). A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, 27(3):447–459.
- Kuo, J. J., Lee, R. H., Zhang, L., and Heckman, C. J. (2006). Essential role of the persistent sodium current in spike initiation during slowly rising inputs in mouse spinal neurones. *The Journal of Physiology*, 574(3):819–834.
- Kuo, J. J., Schonewille, M., Siddique, T., Schults, A. N. A., Fu, R., Bär, P. R., Anelli, R., Heckman, C. J., and Kroese, A. B. A. (2004). Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *Journal of Neurophysiology*, 91(1):571–575.
- Kuo, J. J., Siddique, T., Fu, R., and Heckman, C. J. (2005). Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *The Journal of Physiology*, 563(3):843–854.
- Kuo, T. H., Liu, B. F., Yu, Y., Wuytack, F., Raeymaekers, L., and Tsang, W. (1997). Coordinated regulation of the plasma membrane calcium pump and the sarco(endo)plasmic reticular calcium pump gene expression by Ca²⁺. *Cell Calcium*, 21(6):399–408.
- Kurnellas, M. P., Nicot, A., Shull, G. E., and Elkabes, S. (2005). Plasma membrane calcium ATPase deficiency causes neuronal pathology in the spinal cord: a potential mechanism for neurodegeneration in multiple sclerosis and spinal cord injury. *The FASEB Journal*, 19(2):298–300.
- Kutterer, S. (2011). Elektrophysiologische Grundcharakterisierung von Motoneuronen des Nucleus hypoglossus im Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose. Master’s thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Kwak, S., Hideyama, T., Yamashita, T., and Aizawa, H. (2010). AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS. *Neuropathology*, 30(2):182–188.

- Ladewig, T. and Keller, B. U. (2000). Simultaneous patch-clamp recording and calcium imaging in a rhythmically active neuronal network in the brainstem slice preparation from mouse. *European Journal of Physiology*, 440(2):322–332.
- Ladewig, T., Kloppenburg, P., Lalley, P. M., Zipfel, W. R., Webb, W. W., and Keller, B. U. (2003). Spatial profiles of store-dependent calcium release in motoneurons of the nucleus hypoglossus from newborn mouse. *The Journal of Physiology*, 547(3):775–787.
- Lamanauskas, N. and Nistri, A. (2008). Riluzole blocks persistent Na^+ and Ca^{2+} currents and modulates release of glutamate via presynaptic NMDA receptors on neonatal rat hypoglossal motoneurons in vitro. *The European Journal of Neuroscience*, 27(10):2501–2514.
- Lammel, S., Hetzel, A., Häckel, O., Jones, I., Liss, B., and Roeper, J. (2008). Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron*, 57(5):760–773.
- Lape, R. and Nistri, A. (2000). Current and voltage clamp studies of the spike medium afterhyperpolarization of hypoglossal motoneurons in a rat brain stem slice preparation. *Journal of Neurophysiology*, 83(5):2987–2995.
- Lee, R. H. and Heckman, C. J. (1998a). Bistability in spinal motoneurons in vivo: systematic variations in persistent inward currents. *Journal of Neurophysiology*, 80(2):583–593.
- Lee, R. H. and Heckman, C. J. (1998b). Bistability in spinal motoneurons in vivo: systematic variations in rhythmic firing patterns. *Journal of Neurophysiology*, 80(2):572–582.
- Lee, S. H., Ho, W.-K., and Lee, S.-H. (2009). Characterization of somatic Ca^{2+} clearance mechanisms in young and mature hippocampal granule cells. *Cell Calcium*, 45(5):465–473.
- Lesage, F. (2003). Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology*, 44(1):1–7.
- Li, Y. and Bennett, D. J. (2003). Persistent sodium and calcium currents cause plateau potentials in motoneurons of chronic spinal rats. *Journal of Neurophysiology*, 90(2):857–869.
- Lima, P. and Marrion, N. (2007). Mechanisms underlying activation of the slow AHP in rat hippocampal neurons. *Brain Research*, 1150:74–82.
- Lin, H. C. and Barkhaus, P. E. (2009). Cranial nerve XII: the hypoglossal nerve. *Seminars in Neurology*, 29(1):45–52.

- Lino, M. M., Schneider, C., and Caroni, P. (2002). Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *The Journal of Neuroscience*, 22(12):4825–4832.
- Lips, M. B. and Keller, B. U. (1998). Endogenous calcium buffering in motoneurons of the nucleus hypoglossus from mouse. *The Journal of Physiology*, 511(1):105–117.
- Lips, M. B. and Keller, B. U. (1999). Activity-related calcium dynamics in motoneurons of the nucleus hypoglossus from mouse. *Journal of Neurophysiology*, 82(6):2936–2946.
- Litsky, M. L. and Pfeiffer, D. R. (1997). Regulation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by external adenine nucleotides: the uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations. *Biochemistry*, 36(23):7071–7080.
- Loew, L. M., Carrington, W., Tuft, R. A., and Fay, F. S. (1994). Physiological cytosolic Ca^{2+} transients evoke concurrent mitochondrial depolarizations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26):12579–12583.
- Logroscino, G., Traynor, B. J., Hardiman, O., Chiò, A., Mitchell, D., Swingler, R. J., Millul, A., Benn, E., Beghi, E., and EURALS (2010). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 81(4):385–390.
- Lytton, J., Westlin, M., and Hanley, M. R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(26):17067–17071.
- Mackenzie, I. R. A., Bigio, E. H., Ince, P. G., Geser, F., Neumann, M., Cairns, N. J., Kwong, L. K., Forman, M. S., Ravits, J., Stewart, H., Eisen, A., McClusky, L., Kretzschmar, H. A., Monoranu, C. M., Highley, J. R., Kirby, J., Siddique, T., Shaw, P. J., Lee, V. M. Y., and Trojanowski, J. Q. (2007). Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Annals of Neurology*, 61(5):427–434.
- Malli, R., Frieden, M., Trenker, M., and Graier, W. F. (2005). The role of mitochondria for Ca^{2+} refilling of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(13):12114–12122.
- Malli, R. and Graier, W. F. (2010). Mitochondrial Ca^{2+} channels: Great unknowns with important functions. *FEBS Letters*, 584(10):1942–1947.
- Mancuso, R., Oliván, S., Osta, R., and Navarro, X. (2011a). Evolution of gait abnormalities in SOD1G93A transgenic mice. *Brain Research*, 1406:65–73.

- Mancuso, R., Santos-Nogueira, E., Osta, R., and Navarro, X. (2011b). Electrophysiological analysis of a murine model of motoneuron disease. *Clinical Neurophysiology*, 122(8):1660–1670.
- Mannen, T., Iwata, M., Toyokura, Y., and Nagashima, K. (1977). Preservation of a certain motoneurone group of the sacral cord in amyotrophic lateral sclerosis: its clinical significance. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 40(5):464–469.
- Manuel, M., Iglesias, C., Donnet, M., Leroy, F., Heckman, C. J., and Zytnicki, D. (2009). Fast kinetics, high-frequency oscillations, and subprimary firing range in adult mouse spinal motoneurons. *The Journal of Neuroscience*, 29(36):11246–11256.
- Martin, L. J. (2011). An approach to experimental synaptic pathology using green fluorescent protein-transgenic mice and gene knockout mice to show mitochondrial permeability transition pore-driven excitotoxicity in interneurons and motoneurons. *Toxicologic Pathology*, 39(1):220–233.
- Martin, L. J., Gertz, B., Pan, Y., Price, A. C., Molkentin, J. D., and Chang, Q. (2009). The mitochondrial permeability transition pore in motor neurons: involvement in the pathobiology of ALS mice. *Experimental Neurology*, 218(2):333–346.
- Mattiazzi, M., D’Aurelio, M., Gajewski, C. D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M. F., and Manfredi, G. (2002). Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(33):29626–29633.
- McCormack, J. G., Halestrap, A. P., and Denton, R. M. (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiological Reviews*, 70(2):391–425.
- Meehan, C. F., Moldovan, M., Marklund, S. L., Graffmo, K. S., Nielsen, J. B., and Hultborn, H. (2010a). Intrinsic Properties of Lumbar Motoneurons in the Adult G127insTGCG Superoxide Dismutase-1 Mutant Mouse in Vivo: Evidence for increased persistent inward currents. *Acta Physiologica*, 200(4):361–376.
- Meehan, C. F., Sukiasyan, N., Zhang, M., Nielsen, J. B., and Hultborn, H. (2010b). Intrinsic properties of mouse lumbar motoneurons revealed by intracellular recording in vivo. *Journal of Neurophysiology*, 103(5):2599–2610.
- Michels, G., Khan, I. F., Endres-Becker, J., Rottlaender, D., Herzig, S., Ruhparwar, A., Wahlers, T., and Hoppe, U. C. (2009). Regulation of the human cardiac mitochondrial Ca²⁺ uptake by 2 different voltage-gated Ca²⁺ channels. *Circulation*, 119(18):2435–2443.

- Milanese, M., Zappettini, S., Onofri, F., Musazzi, L., Tardito, D., Bonifacino, T., Messina, M., Racagni, G., Usai, C., Benfenati, F., Popoli, M., and Bonanno, G. (2010). Abnormal exocytotic release of glutamate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 116(6):1028–1042.
- Miles, G. B., Dai, Y., and Brownstone, R. M. (2005). Mechanisms underlying the early phase of spike frequency adaptation in mouse spinal motoneurons. *The Journal of Physiology*, 566(2):519–532.
- Minta, A., Kao, J. P., and Tsien, R. Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(14):8171–8178.
- Mitra, P. and Brownstone, R. M. (2011). An In Vitro Spinal Cord Slice Preparation for Recording from Lumbar Motoneurons of the Adult Mouse. *Journal of Neurophysiology*, [Epub ahead of print].
- Mogyoros, I., Kiernan, M. C., Burke, D., and Bostock, H. (1998). Strength-duration properties of sensory and motor axons in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 121(5):851–859.
- Montero, M., Lobatón, C. D., Hernández-Sanmiguel, E., Santo-Domingo, J., Vay, L., Moreno, A., and Alvarez, J. (2004). Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant flavonoids. *The Biochemical Journal*, 384(1):19–24.
- Moreau, B., Nelson, C., and Parekh, A. B. (2006). Biphasic regulation of mitochondrial Ca^{2+} uptake by cytosolic Ca^{2+} concentration. *Current Biology*, 16(16):1672–1677.
- Moschovakis, A. K. (1997). The neural integrators of the mammalian saccadic system. *Frontiers in Bioscience*, 2:d552–77.
- Nakanishi, S. T. and Whelan, P. J. (2010). Diversification of intrinsic motoneuron electrical properties during normal development and botulinum toxin-induced muscle paralysis in early postnatal mice. *Journal of Neurophysiology*, 103(5):2833–2845.
- Neher, E. and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554):799–802.
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. Y. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314(5796):130–133.

- Nguyen, K. T., Barrett, J. N., García-Chacón, L., David, G., and Barrett, E. F. (2011). Repetitive nerve stimulation transiently opens the mitochondrial permeability transition pore in motor nerve terminals of symptomatic mutant SOD1 mice. *Neurobiology of Disease*, 42(3):381–390.
- Nguyen, K. T., García-Chacón, L. E., Barrett, J. N., Barrett, E. F., and David, G. (2009). The $\Psi(m)$ depolarization that accompanies mitochondrial Ca^{2+} uptake is greater in mutant SOD1 than in wild-type mouse motor terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6):2007–2011.
- Nicolli, A., Basso, E., Petronilli, V., Wenger, R. M., and Bernardi, P. (1996). Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(4):2185–2192.
- Nikon (2011). <http://www.microscopyu.com/articles/digitalimaging/ccdintro.html> (abgerufen am 01.08.2011).
- Nimchinsky, E. A., Young, W. G., Yeung, G., Shah, R. A., Gordon, J. W., Bloom, F. E., Morrison, J. H., and Hof, P. R. (2000). Differential vulnerability of oculomotor, facial, and hypoglossal nuclei in G86R superoxide dismutase transgenic mice. *The Journal of Comparative Neurology*, 416(1):112–125.
- Numata, M., Petrecca, K., Lake, N., and Orlowski, J. (1998). Identification of a mitochondrial $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchanger. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(12):6951–6959.
- Numberger, M. and Draguhn, A. (1996). *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, 1th edition.
- Nyquist, H. (2002). Certain topics in telegraph transmission theory (nachdruck von 1928). *Proceedings of the IEEE*, 90(2 (Nachdruck von 1928)):617–644.
- Owen, C. S. (1991). Spectra of intracellular Fura-2. *Cell Calcium*, 12(6):385–393.
- Palecek, J., Lips, M. B., and Keller, B. U. (1999). Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord. *The Journal of Physiology*, 520 Pt 2:485–502.
- Palty, R., Silverman, W. F., Hershfinkel, M., Caporale, T., Sensi, S. L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., Khananshvil, D., and Sekler, I. (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1):436–441.
- Pambo-Pambo, A., Durand, J., and Gueritaud, J.-P. (2009). Early excitability changes in lumbar motoneurons of transgenic SOD1G85R and SOD1G(93A-Low) mice. *Journal of Neurophysiology*, 102(6):3627–3642.

- Pasinelli, P. and Brown, R. H. (2006). Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9):710–723.
- Paxinos, G. and Franklin, K. B. (2007). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Third Edition*. Academic Press, 3 edition.
- Perocchi, F., Gohil, V. M., Girgis, H. S., Bao, X. R., McCombs, J. E., Palmer, A. E., and Mootha, V. K. (2010). MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca^{2+} uptake. *Nature*, 467(7313):291–296.
- Perrier, J.-F. and Hounsgaard, J. (2000). Development and regulation of response properties in spinal cord motoneurons. *Brain Research Bulletin*, 53(5):529–535.
- Perrier, J.-F. and Hounsgaard, J. (2003). 5-HT₂ receptors promote plateau potentials in turtle spinal motoneurons by facilitating an L-type calcium current. *Journal of Neurophysiology*, 89(2):954–959.
- Philips, T. and Robberecht, W. (2011). Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *The Lancet Neurology*, 10(3):253–263.
- Pieri, M., Albo, F., Gaetti, C., Spalloni, A., Bengtson, C. P., Longone, P., Cavalcanti, S., and Zona, C. (2003). Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 351(3):153–156.
- Pieri, M., Carunchio, I., Curcio, L., Mercuri, N. B., and Zona, C. (2009). Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, 215(2):368–379.
- Pottorf, W. J., Duckles, S. P., and Buchholz, J. N. (2000). Adrenergic nerves compensate for a decline in calcium buffering during ageing. *Journal of Autonomic Pharmacology*, 20(1):1–13.
- Pottorf, W. J. and Thayer, S. A. (2002). Transient rise in intracellular calcium produces a long-lasting increase in plasma membrane calcium pump activity in rat sensory neurons. *Journal of Neurochemistry*, 83(4):1002–1008.
- Pozzo-Miller, L. D., Pivovarova, N. B., Leapman, R. D., Buchanan, R. A., Reese, T. S., and Andrews, S. B. (1997). Activity-dependent calcium sequestration in dendrites of hippocampal neurons in brain slices. *The Journal of Neuroscience*, 17(22):8729–8738.
- Pramatarova, A., Laganière, J., Roussel, J., Brisebois, K., and Rouleau, G. A. (2001). Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *The Journal of Neuroscience*, 21(10):3369–3374.

- Pun, S., Santos, A. F., Saxena, S., Xu, L., and Caroni, P. (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nature Neuroscience*, 9(3):408–419.
- Purvis, L. K. and Butera, R. J. (2005). Ionic current model of a hypoglossal motoneuron. *Journal of Neurophysiology*, 93(2):723–733.
- Quednau, B. D., Nicoll, D. A., and Philipson, K. D. (1997). Tissue specificity and alternative splicing of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. *The American Journal of Physiology*, 272(4 Pt 1):C1250–61.
- Quinlan, K. A., Schuster, J. E., Fu, R., Siddique, T., and Heckman, C. J. (2011). Altered postnatal maturation of electrical properties in spinal motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Physiology*, 589(9):2245–2260.
- Rekling, J. C., Funk, G. D., Bayliss, D. A., Dong, X. W., and Feldman, J. L. (2000). Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiological Reviews*, 80(2):767–852.
- Rice, A. D., Fuglevand, A. J., Laine, C. M., and Fregosi, R. F. (2011). Synchronization of presynaptic input to motor units of tongue, inspiratory intercostal and diaphragm muscles. *Journal of Neurophysiology*, 105(5):2330–2336.
- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., and Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*, 262(5134):744–747.
- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De Stefani, D., Giorgi, C., Leo, S., Rimessi, A., Siviero, R., Zecchini, E., and Pinton, P. (2009). Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. *BBA - Bioenergetics*, 1787(11):1342–1351.
- Rizzuto, R., Simpson, A. W., Brini, M., and Pozzan, T. (1992). Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, 358(6384):325–327.
- Robertson, J., Sanelli, T., Xiao, S., Yang, W., Horne, P., Hammond, R., Pioro, E. P., and Strong, M. J. (2007). Lack of TDP-43 abnormalities in mutant SOD1 transgenic mice shows disparity with ALS. *Neuroscience Letters*, 420(2):128–132.
- Robinson, D. A. (1970). Oculomotor unit behavior in the monkey. *Journal of Neurophysiology*, 33(3):393–403.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., and Deng, H. X. (1993). Mutations in Cu/Zn

- superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415):59–62.
- Ross, C. A. and Poirier, M. A. (2005). Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(11):891–898.
- Rothstein, J. D. (2009). Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 65 Suppl 1:S3–9.
- Rothstein, J. D., Tsai, G., Kuncl, R. W., Clawson, L., Cornblath, D. R., Drachman, D. B., Pestronk, A., Stauch, B. L., and Coyle, J. T. (1990). Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 28(1):18–25.
- Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A. I., Martin, L. J., and Kuncl, R. W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 38(1):73–84.
- Rudy, B. and McBain, C. J. (2001). Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends in Neurosciences*, 24(9):517–526.
- Ryu, S.-Y., Beutner, G., Kinnally, K. W., Dirksen, R. T., and Sheu, S.-S. (2011). Single channel characterization of the mitochondrial ryanodine receptor in heart mitoplasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(24):21324–21329.
- Saboisky, J. P., Butler, J. E., McKenzie, D. K., Gorman, R. B., Trinder, J. A., White, D. P., and Gandevia, S. C. (2007). Neural drive to human genioglossus in obstructive sleep apnoea. *The Journal of Physiology*, 585(1):135–146.
- Safronov, B. V. and Vogel, W. (1995). Single voltage-activated Na⁺ and K⁺ channels in the somata of rat motoneurons. *The Journal of Physiology*, 487(1):91–106.
- Safronov, B. V. and Vogel, W. (1998). Large conductance Ca(2⁺)-activated K⁺ channels in the soma of rat motoneurons. *The Journal of Membrane Biology*, 162(1):9–15.
- Salnikov, V., Lukyanenko, Y. O., Lederer, W. J., and Lukyanenko, V. (2009). Distribution of ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 30(3-4):161–170.
- Sandyk, R. (2006). Serotonergic mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *The International Journal of Neuroscience*, 116(7):775–826.
- Santo-Domingo, J. and Demaurex, N. (2010). Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(6-7):907–912.

- Sattler, R., Charlton, M. P., Hafner, M., and Tymianski, M. (1998). Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 71(6):2349–2364.
- Scharfman, H. E., Mercurio, T. C., Goodman, J. H., Wilson, M. A., and MacLusky, N. J. (2003). Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of Neuroscience*, 23(37):11641–11652.
- Schütz, B. (2005). Imbalanced excitatory to inhibitory synaptic input precedes motor neuron degeneration in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 20(1):131–140.
- Shaw, P. J. and Eggett, C. J. (2000). Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, 247(1):I17–27.
- Sherman-Gold, R., editor (2006). *The Axon CNS Guide*. Molecular Devices Corporation.
- Shimomura, O., Johnson, F., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59:223–239.
- Shmigol, A., Kostyuk, P., and Verkhratsky, A. (1995). Dual action of thapsigargin on calcium mobilization in sensory neurons: inhibition of Ca^{2+} uptake by caffeine-sensitive pools and blockade of plasmalemmal Ca^{2+} channels. *Neuroscience*, 65(4):1109–1118.
- Siklós, L., Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R. G., Joó, F., and Appel, S. H. (1996). Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 39(2):203–216.
- Silani, V., Messina, S., Poletti, B., Morelli, C., Doretto, A., Ticozzi, N., and Maderna, L. (2011). The diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis in 2010. *Archives Italiennes de Biologie*, 149(1):5–27.
- Sinnesphysiologie, H. (2011). <http://www.sinnesphysiologie.de/gruvo03/zns/mcortex.htm> (abgerufen am 19.8.11).
- Smets, I., Caplanusi, A., Despa, S., Molnar, Z., Radu, M., VandeVen, M., Ameloot, M., and Steels, P. (2004). Ca^{2+} uptake in mitochondria occurs via the reverse action of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in metabolically inhibited MDCK cells. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 286(4):F784–794.

- Smittkamp, S. E., Brown, J. W., and Stanford, J. A. (2008). Time-course and characterization of orolingual motor deficits in B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J mice. *Neuroscience*, 151(2):613–621.
- Solomon, J. A., Tarnopolsky, M. A., and Hamadeh, M. J. (2011). One Universal Common Endpoint in Mouse Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PloS One*, 6(6):e20582.
- Song, J. H., Huang, C. S., Nagata, K., Yeh, J. Z., and Narahashi, T. (1997). Differential action of riluzole on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 282(2):707–714.
- Sparagna, G. C., Gunter, K. K., Sheu, S. S., and Gunter, T. E. (1995). Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(46):27510–27515.
- Starkov, A. A. (2010). The molecular identity of the mitochondrial Ca(2+) sequestration system. *The FEBS Journal*, 277(18):3652–3663.
- Stevens, J. P. (2007). *Intermediate Statistics: A Modern Approach, Third Edition*. Routledge Academic, 3 edition.
- Stokes, G. (1852). On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions*, 142:463–562.
- Storm, J. F. (1989). An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Physiology*, 409:171–190.
- Stout, A. K. and Reynolds, I. J. (1999). High-affinity calcium indicators underestimate increases in intracellular calcium concentrations associated with excitotoxic glutamate stimulations. *Neuroscience*, 89(1):91–100.
- Strehler, E. E., Caride, A. J., Filoteo, A. G., Xiong, Y., Penniston, J. T., and Enyedi, A. (2007). Plasma Membrane Ca²⁺ ATPases as Dynamic Regulators of Cellular Calcium Handling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1099(1):226–236.
- Sukiasyan, N., Hultborn, H., and Zhang, M. (2009). Distribution of calcium channel Ca(V)1.3 immunoreactivity in the rat spinal cord and brain stem. *Neuroscience*, 159(1):217–235.
- Tarras-Wahlberg, S. and Reklings, J. C. (2009). Hypoglossal motoneurons in newborn mice receive respiratory drive from both sides of the medulla. *Neuroscience*, 161(1):259–268.
- Thayer, S. A. and Miller, R. J. (1990). Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. *The Journal of Physiology*, 425:85–115.

- Thibault, O., Porter, N. M., Chen, K. C., Blalock, E. M., Kaminker, P. G., Clodfelter, G. V., Brewer, L. D., and Landfield, P. W. (1998). Calcium dysregulation in neuronal aging and Alzheimer's disease: history and new directions. *Cell Calcium*, 24(5-6):417–433.
- Ticozzi, N., Tiloca, C., Morelli, C., Colombrita, C., Poletti, B., Doretti, A., Maderna, L., Messina, S., Ratti, A., and Silani, V. (2011). Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Archives Italiennes de Biologie*, 149(1):65–82.
- Trenker, M., Malli, R., Fertschai, I., Levak-Frank, S., and Graier, W. F. (2007). Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca^{2+} uniport. *Nature Cell Biology*, 9(4):445–452.
- Tymianski, M., Charlton, M. P., Carlen, P. L., and Tator, C. H. (1993). Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 13(5):2085–2104.
- Umemiya, M. and Berger, A. J. (1994). Properties and function of low- and high-voltage-activated Ca^{2+} channels in hypoglossal motoneurons. *The Journal of Neuroscience*, 14(9):5652–5660.
- Uto, A., Arai, H., and Ogawa, Y. (1991). Reassessment of Fura-2 and the ratio method for determination of intracellular Ca^{2+} concentrations. *Cell Calcium*, 12(1):29–37.
- van den Berg, L. H. (2011). ALS: disease or syndrome? *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 82(7):711.
- Van Den Bosch, L. (2011). Genetic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011:348765.
- Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E., and Robberecht, W. (2006). The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762(11-12):1068–1082.
- Van Den Bosch, L., Verhoeven, K., De Smedt, H., Wuytack, F., Missiaen, L., and Robberecht, W. (1999). Calcium handling proteins in isolated spinal motoneurons. *Life Sciences*, 65(15):1597–1606.
- van Welsem, M. E., Hogenhuis, J. A., Meininger, V., Metsaars, W. P., Hauw, J.-J., and Seilhean, D. (2002). The relationship between Bunina bodies, skein-like inclusions and neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 103(6):583–589.
- van Zundert, B., Peuscher, M. H., Hynynen, M., Chen, A., Neve, R. L., Brown, R. H., Constantine-Paton, M., and Bellingham, M. C. (2008). Neonatal neuronal circuitry

- shows hyperexcitable disturbance in a mouse model of the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Neuroscience*, 28(43):10864–10874.
- Vanacore, N., Binazzi, A., Bottazzi, M., and Belli, S. (2006). Amyotrophic lateral sclerosis in an Italian professional soccer player. *Parkinsonism & Related Disorders*, 12(5):327–329.
- Vanselow, B. K. and Keller, B. U. (2000). Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurones from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneurone disease. *The Journal of Physiology*, 525(2):433–445.
- Verkhratsky, A. (2005). Physiology and Pathophysiology of the Calcium Store in the Endoplasmic Reticulum of Neurons. *Physiological Reviews*, 85(1):201–279.
- Viana, F., Bayliss, D. A., and Berger, A. J. (1993a). Calcium conductances and their role in the firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *Journal of Neurophysiology*, 69(6):2137–2149.
- Viana, F., Bayliss, D. A., and Berger, A. J. (1993b). Multiple potassium conductances and their role in action potential repolarization and repetitive firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *Journal of Neurophysiology*, 69(6):2150–2163.
- Viana, F., Bayliss, D. A., and Berger, A. J. (1994). Postnatal changes in rat hypoglossal motoneuron membrane properties. *Neuroscience*, 59(1):131–148.
- Viana, F., Bayliss, D. A., and Berger, A. J. (1995). Repetitive firing properties of developing rat brainstem motoneurons. *The Journal of Physiology*, 486 (Pt 3):745–761.
- Vila, L., Barrett, E. F., and Barrett, J. N. (2003). Stimulation-induced mitochondrial $[Ca^{2+}]$ elevations in mouse motor terminals: comparison of wild-type with SOD1-G93A. *The Journal of Physiology*, 549(Pt 3):719–728.
- Volz, L. M., Mann, L. B., Russell, J. A., Jackson, M. A., Levenson, G. E., and Connor, N. P. (2007). Biochemistry of anterior, medial, and posterior genioglossus muscle in the rat. *Dysphagia*, 22(3):210–214.
- von Lewinski, F., Fuchs, J., Vanselow, B. K., and Keller, B. U. (2008). Low Ca^{2+} buffering in hypoglossal motoneurons of mutant SOD1 (G93A) mice. *Neuroscience Letters*, 445(3):224–228.
- von Lewinski, F. and Keller, B. U. (2005). Ca^{2+} , mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends in Neurosciences*, 28(9):494–500.
- Vucic, S. and Kiernan, M. C. (2006a). Axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neurophysiology*, 117(7):1458–1466.

- Vucic, S. and Kiernan, M. C. (2006b). Novel threshold tracking techniques suggest that cortical hyperexcitability is an early feature of motor neuron disease. *Brain*, 129(9):2436–2446.
- Wada, K. and Sakaguchi, Y. (2007). Repetitive firing of a model motoneuron: inhibitory effect of a Ca^{2+} -activated potassium conductance on the slope of the frequency-current relationship. *Neuroscience Research*, 57(2):259–267.
- Wakui, M., Osipchuk, Y. V., and Petersen, O. H. (1990). Receptor-activated cytoplasmic Ca^{2+} spiking mediated by inositol trisphosphate is due to Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *Cell*, 63(5):1025–1032.
- Waldeck-Weiermair, M., Duan, X., Naghdi, S., Khan, M. J., Trenker, M., Malli, R., and Graier, W. F. (2010a). Uncoupling protein 3 adjusts mitochondrial Ca^{2+} uptake to high and low Ca^{2+} signals. *Cell Calcium*, 48(5):288–301.
- Waldeck-Weiermair, M., Jean-Quartier, C., Rost, R., Khan, M. J., Vishnu, N., Bondarenko, A. I., Imamura, H., MALLI, R., and Graier, W. F. (2011). The leucine zipper EF hand-containing transmembrane protein 1 (LETM1) and uncoupling proteins- 2 and 3 (UCP2/3) contribute to two distinct mitochondrial Ca^{2+} uptake pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 286(32):28444–28455.
- Waldeck-Weiermair, M., Malli, R., Naghdi, S., Trenker, M., Kahn, M. J., and Graier, W. F. (2010b). The contribution of UCP2 and UCP3 to mitochondrial Ca^{2+} uptake is differentially determined by the source of supplied Ca^{2+} . *Cell Calcium*, 47(5):433–440.
- Wanaverbecq, N., Marsh, S. J., Al-Qatari, M., and Brown, D. A. (2003). The plasma membrane calcium-ATPase as a major mechanism for intracellular calcium regulation in neurones from the rat superior cervical ganglion. *The Journal of Physiology*, 550(1):83–101.
- Wegorzewska, I. and Baloh, R. H. (2010). TDP-43-Based Animal Models of Neurodegeneration: New Insights into ALS Pathology and Pathophysiology. *Neuro-Degenerative Diseases*, 8(4):262–274.
- Wojcikiewicz, R. J. (1995). Type I, II, and III inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are unequally susceptible to down-regulation and are expressed in markedly different proportions in different cell types. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(19):11678–11683.
- Wong, P. C., Pardo, C. A., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sisodia, S. S., Cleveland, D. W., and Price, D. L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*, 14(6):1105–1116.

- Xia, X. M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J. E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C. T., Lutsenko, S., Maylie, J., and Adelman, J. P. (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, 395(6701):503–507.
- Xiong, J., Verkhratsky, A., and Toescu, E. C. (2002). Changes in mitochondrial status associated with altered Ca^{2+} homeostasis in aged cerebellar granule neurons in brain slices. *The Journal of Neuroscience*, 22(24):10761–10771.
- Xu, H., Ginsburg, K. S., Hall, D. D., Zimmermann, M., Stein, I. S., Zhang, M., Tandan, S., Hill, J. A., Horne, M. C., Bers, D., and Hell, J. W. (2010). Targeting of Protein Phosphatases PP2A and PP2B to the C-Terminus of the L-Type Calcium Channel $\text{Ca}_v1.2$. *Biochemistry*, 49(48):10298–10307.
- Zaidi, A. and Michaelis, M. L. (1999). Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane $\text{Ca}(2+)\text{-ATPase}$. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(7-8):810–821.
- Zang, D. W. and Cheema, S. S. (2002). Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1(G93A G1H) transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 332(2):99–102.
- Zona, C., Pieri, M., and Carunchio, I. (2006). Voltage-dependent sodium channels in spinal cord motor neurons display rapid recovery from fast inactivation in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurophysiology*, 96(6):3314–3322.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Gliederung des Motorsystems	1
1.2	Degenerationsmechanismen	5
1.3	Morphologisch-histologische Befunde in Motoneuronen bei ALS	10
1.4	Calciumhomöostase von resistenten und vulnerablen Motoneuronen	12
1.5	Charakterisierung des SOD1-G93A ALS-Mausmodells	15
1.6	Ionenkanäle in Motoneuronen	17
1.7	Entladungseigenschaften von Motoneuronen	19
1.8	Übererregbarkeit der Motoneurone bei ALS	21
1.9	Calciumhomöostase in Motoneuronen	23
1.10	Intrazelluläre Calciumerhöhung während rhythmischer Aktivität	24
1.11	Eigenschaften mitochondrialer Calciumtransporter	27
1.12	ER-Mitochondrien Calciumzyklus	30
1.13	Mitochondriale Schädigung bei ALS	33
2.1	Gelbild einer Genotypisierung	37
2.2	Schnittebenen	39
2.3	Schaltbilder der Vorverstärker	41
2.4	Messplatz	42
2.5	Konfigurationen und Stromantwort auf einen Testpuls	45
2.6	Stimulationsprotokolle	47
2.7	Auswertung von persistierenden Einwärtsströmen	50
2.8	Jablonski-Diagramm	51
2.9	Struktur und Anregungsspektren von Rh123 und Fura-2	52
2.10	Optische Filter	54
2.11	Auswertung der Fura-2-Signale	56
2.12	Kalibrierung der Fluoreszenzsignale	58
3.1	Identifikation gemessener hMN	65
3.2	Passive Eigenschaften und Hyperpolarisationscharakteristika von Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus	67
3.3	Aktive Eigenschaften von Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus	68
3.4	cAHP und Rheobase von Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus	69
3.5	Persistierende Einwärtsströme in adulten hMN	72
3.6	Identifikation gemessener oMN	73

3.7	Vergleich elektrophysiologischer Charakteristika zwischen hMN und oMN . .	75
3.8	Füllung eines Motoneurons mit Fura-2	76
3.9	Fura-2-Fluoreszenzsignale während elektrischer Stimulation von hMN	78
3.10	Calciumsignale der Motoneurone des Ncl. Hypoglossus	79
3.11	Mitochondriale Entkopplung der Motoneurone des Ncl. Hypoglossus	81
3.12	Blockade des mitochondrialen Calciumuniporters in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus	83
3.13	Blockade des mitochondrialen Natrium-Calcium-Austauschers in Motoneu- ronen des Ncl. Hypoglossus	84
3.14	Blockade der mPTP-Öffnung in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus	86
3.15	Mitochondriales Membranpotential	87
3.16	Blockade der SERCA in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus	89
3.17	Calciumtransport über die Plasmamembran in Motoneuronen des Ncl. Hy- poglossus	91
3.18	Calciumsignale der Motoneurone des Ncl. Oculomotorius	93
3.19	Mitochondriale Entkopplung der Motoneurone des Ncl. Oculomotorius . . .	95
4.1	Aktivierung von SK- und BK-Kanälen durch unterschiedliche Calciumdo- mänen	106
4.2	Verschiedene Transporter bestimmen die Phasen der Erholung des Calcium- signals	112
4.3	Keine Calciumhomöostasestörung um P70	119
4.4	Entkopplung der Mitochondrien von Tieren um P70	120
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	121

Tabellenverzeichnis

2.1	PCR-Ansatz	37
2.2	PCR-Bedingungen	37
2.3	Parameter zum Ziehen von Glaspipetten	43
2.4	Antikörper	59
3.1	Elektrophysiologische Charakteristika von adulten Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus	66
3.2	Elektrophysiologische Daten aus Stimulationen der fluorometrischen Mes- sungen bei hMN	71
3.3	Persistierende Einwärtsströme bei hMN	71
3.4	Elektrophysiologische Daten aus Stimulationen der fluorometrischen Mes- sungen bei oMN	74
3.5	Calciumsignale der Motoneurone des Ncl. Hypoglossus	77
3.6	Mitochondriale Entkopplung der Motoneurone des Ncl. Hypoglossus	80
3.7	Blockade des mitochondrialen Calciumuniporters in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus	82
3.8	Blockade des mitochondrialen Natrium-Calcium-Austauschers in Motoneu- ronen des Ncl. Hypoglossus	84
3.9	Blockade der mPTP-Öffnung in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus	86
3.10	Blockade der SERCA in Motoneuronen des Ncl. Hypoglossus	88
3.11	Calciumtransport über die Plasmamembran in Motoneuronen des Ncl. Hy- poglossus	90
3.12	Calciumsignale der Motoneurone des Ncl. Oculomotorius	92
3.13	Mitochondriale Entkopplung der Motoneurone des Ncl. Oculomotorius . . .	94
4.1	Literaturvergleich der elektrophysiologischen Charakteristika von Motoneu- ronen in Wildtypmäusen	101

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren an der Phillips-Universität Marburg die Damen und Herren:

Aumüller, Baranowski, Bastians, Bauer, Becker, Berndt, Bette, Boekhoff, Breit, Büch, Burchert, Carell, Daut, del Rey, Eckhorn, Eilers, Eickmann, Elsässer, Feuser, Fritz, Garten, Gaubatz, Grzeschik, Gudermann, Hasilik, Hassel, Huber, Jakob, Jungclas, Kirchner, Kohlmann, Krebber, Kunz, Lang, Lill, Liss, Löffler, Löffler, Lohoff, Lüers, Maisner, Mandrek, Moll, Morherr, Müller, Müller, Müller-Brüsselbach, Petz, Plant, Portenier, Renkawitz-Pohl, Renz, Ries, Röhm, Röper, Schäfer, Schäfer, Schulz, Schulze, Schütz, Schwarting, Suske, Voigt, Weihe, Westermann, Wilms

Mein Dank geht an:

- **PD Dr. Burkhard Schütz:** Eine externe Doktorarbeit zu unterstützen und bei Bedarf einzuspringen ist keine Selbstverständlichkeit. Danke für das Vertrauen.
- **Prof. Dr. Jochen Roeper:** Die Finanzierung und die Unterstützung bis kurz vor Ende hat mich dahin gebracht, wo ich jetzt bin. Ich habe viel gelernt.
- **Prof. Dr. Bernhard U. Keller:** Ohne Sie säße ich heute noch vor einem nicht funktionierenden Imagingsystem. Vielen Dank für die tolle Kooperation, die fruchtbaren Diskussionen, die Unterstützung weit darüber hinaus und die Zukunftsperspektive. Auf weiterhin gute Zusammenarbeit.
- **Julia und Sabine:** Was hätte ich nur ohne euch gemacht. Das Niederschreiben aller Situationen, bei denen ihr mir auf alle erdenkliche Weise geholfen und mich unterstützt habt, würde noch mal so viele Seiten füllen wie die ganze Doktorarbeit. Kann man sich bessere Freunde und Kollegen vorstellen? Es war eine sehr schöne Zeit!
- **Sylvie,** meine erste Diplomandin. Danke für die technische Unterstützung und die personelle Verdopplung des ALS-Teams.
- **Anna, Alex, Manuel:** Wissenschaftliche Diskussionen, gegenseitige Hilfe und vor allem persönliche Unterstützung in schwierigen Situationen. Auf euch war immer Verlass.
- **Silvi:** Er wusste nicht, was er an dir hatte.
- **Raphaella, Annabelle, Verena, Alois, Marvin:** Hat Spaß gemacht, mit euch die Zeit zu verbringen, in oder außerhalb des Labors.
- **Jean, Silvia:** Auf Erfahrung zurückgreifen können gibt Sicherheit.
- **Günther Amrhein, Anja Gerlach, Dittmar Ludwig, Blazenska Jordan, Annika Parg, Harald Schalk, Thomas Wulf:** Technische und strukturelle Hilfe ist essentiell für jedes Forschungsprojekt. Ohne euch wäre nichts gelaufen.
- **Heimo, Nina, Stephan:** Manchmal war auch außerhalb des Labors dringend moralische Unterstützung und Ablenkung nötig.
- **Meine Eltern, meine Brüder, meine Großeltern und meine Patentante:** Auch wenn ich mich manchmal sehr rar gemacht habe: Ich habe euren Rückhalt immer gespürt.